DIE PYRROLIZIDINALKALOIDE AUS SENECIO DORONICUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

MANFRED FRISSE
aus
LEVERKUSEN-BERGISCH-NEUKIRCHEN

BONN 1980

DIE PYRROLIZIDINALKALOIDE AUS SENECIO DORONICUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

MANFRED FRISSE

aus

LEVERKUSEN-BERGISCH-NEUKIRCHEN

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

1. Referent: *Prof. Dr. E. Röder*

2. Referent: *Prof. Dr. H. J. Roth*

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Für M.

und meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	7
1.1.	Geschichtlicher Überblick	7
1.2.	Chemie der Pyrrolizidinalkaloide	8
1.3.	Biochemie der Pyrrolizidinalkaloide	11
1.4.	Toxikologie der Pyrrolizidinalkaloide	14
2.	PROBLEMSTELLUNG	18
3.	BOTANISCHE BESCHREIBUNG	20
4.	BESCHAFFUNG DES DROGENMATERIALS	21
5.	EXTRAKTION UND ISOLIERUNG	22
5.1.	Nachweis der Pyrrolizidinalkaloide	22
5.2.	Extraktion der Pyrrolizidinalkaloide	24
5.3.	Trennung und Isolierung der Pyrrolizidin-alkaloide	25
5.3.1.	Säulenchromatographie	25
5.3.2.	Dünnschichtchromatographie	26
6.	STRUKTURAUFKLÄRUNG	29
6.1.	Alkaloid A: Doronenin	29
6.2.	Alkaloid B: Bulgarsenin	39
6.3.	Necine	49
6.4.	Necinsäure	51
6.4.1.	Ringförmige Struktur: Nemorensinsäure	51
6.4.2.	Offenkettige Struktur	59

		Seite
7.	PARTIALSYNTHESE DER SÄUREN	60
7.1.	Versuch der Synthese der 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure	61
7.1.1.	Versuch der Synthese des γ-Bromtiglinsäuremethylesters durch Wohl-Ziegler-Bromierung	62
7.1.2.	Versuch der Synthese des γ-Bromtiglinsäuremethylesters durch Wittig-Reaktion	64
7.2.	Synthese der 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure	65
7.3.	Versuch der Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure	68
7.4.	Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure	69
8.	ANALYTIK	72
8.1.	Gaschromatographische Analyse	72
8.1.1.	Qualitative GC-Analyse	73
8.1.2.	Quantitative GC-Analyse	75
8.2.	Potentiometrische Titration	75
9.	ZUSAMMENFASSUNG	78
10.	EXPERIMENTELLER TEIL	80
10.1.	Allgemeine Angaben	80
10.2.	Beschreibung der Versuche zu Kap.7.	82
10.3.	Beschreibung der Versuche zu Kap.8.	96
11.	LITERATURVERZEICHNIS	105

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichtlicher Überblick

Senecio, die größte Gattung, die zur Pflanzenfamilie der Asteraceen gehört, zählt über 1200 Arten. Die meisten von ihnen enthalten Alkaloide, die "Senecio-Alkaloide".

Über die medizinische Anwendung der Senecio, die früher noch unter dem Namen "Erigeron" geläufig war, wurde erstmals von *Theophrast*, einem Schüler von *Aristoteles*, im 4. Jh. v. Chr. berichtet.

Eine umfassendere Beschreibung lieferte dann *Dioskorides* im 1. Jh. n. Chr. Beide schrieben der Senecio neben der Linderung bei Gallenschmerzen eine stark wundheilende Wirkung zu.

Plinius, ein Zeitgenosse von *Dioskorides*, sagte der Senecio einen heilenden Effekt bei Gelbsucht, sowie bei allen Erkrankungen der Leber, der Blase und des Herzens nach.

Plinius' Vorstellungen wurden 150 Jahre später von *Galenus* übernommen. Seine Darlegungen in "De simplicium medikamentorum temperamentibus et facultatibus" genossen bis in das Mittelalter höchste Anerkennung.

Erst *Tabernaemontanus* (1613) widersetzte sich dieser Meinung. Neben den o.g. Indikationen wandte er erstmals die Senecio als Hämostypticum an. Diese Anwendung gelangte in der Folgezeit vor allem in der Frauenheilkunde zu großer Bedeutung.

Tournefort (1715) sprach der Senecio dann diese Wirkung ab. Er schrieb ihr einen allgemein schmerz- und krampfstillenden, sowie einen erweichenden Effekt zu. In der Volksheilkunde besaß sie trotzdem weiterhin große Beachtung bei gynäkologischen Blutungen.

1921 in *Dinands* "Handbuch der Pflanzenheilkunde" wurde der Senecio

wiederum eine heilende Wirkung bei Menstruationsbeschwerden und bei Blutungen aller Art nachgesagt.
Aufgrund der großen arzneilichen Bedeutung der Senecio in der damaligen Volksheilkunde war es naheliegend, die Wirkstoffe zu isolieren und ihre chemischen und pharmakologischen Eigenschaften aufzuklären.
Grandval und *Lajoux* konnten 1891 erstmalig die Alkaloide Senecionin und Senecin nachweisen. Rund 50 Jahre später waren die meisten Senecio-Arten auf ihre Inhaltsstoffe untersucht worden. Dabei stellte sich heraus, daß ihre Wirkstoffe zur Gruppe der Pyrrolizidinalkaloide gehören.
Diese Stoffklasse ist nicht nur auf die Gattung Senecio beschränkt. Ihr Vorkommen ist in den letzten Jahren in den verschiedensten Pflanzenfamilien nachgewiesen worden. Es sind dies neben den Asteraceen die Mimosaceen, Caesalpiniaceen, Fabaceen, Rhizophoraceen, Santalaceen, Sapotaceen, Boraginaceen, Cichoriaceen, Orchidaceen und Poaceen.
In der Literatur sind bis heute etwa 120 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide beschrieben worden.

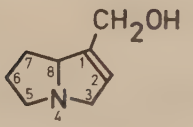
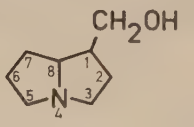
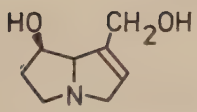
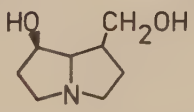
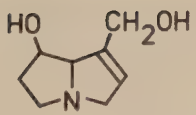
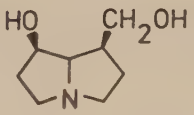
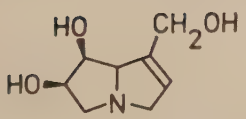
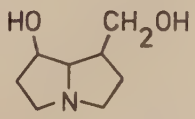
1.2. Chemie der Pyrrolizidinalkaloide

Adams et al. [1] erforschten die Senecio-Alkaloide besonders intensiv. Sie konnten die meisten der Alkaloide als Ester von Aminoalkoholen mit verschiedenen organischen Säuren identifizieren.
Der Aminoalkohol, von *Adams* "Necin" [1] genannt, leitet sich vom

1) *R.Adams* und *T.R.Govindachari*, J.Am.Chem.Soc. 71, 1953 (1949)

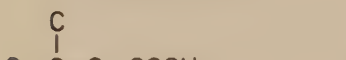
Pyrrolizidingerüst ab. Dieses bicyclische Ringsystem wird für die Pyrrolizidinalkaloide durch eine Hydroxymethylgruppe in Position 1 charakteristisch. Weitere alkoholische Gruppen sind häufig in Stellung 7, seltener in 2 oder 6 vorhanden. Der Ring kann gesättigt sein oder in Position 1,2 eine Doppelbindung aufweisen. Die Tabelle 1 gibt die wichtigsten Necine wieder.

Tabelle 1: Struktur der Necine

Ungesättigte Necine	Gesättigte Necine
	
Supinidin	Trachelanthamidin
	
Retronecin	Hastanecin
	
Heliotridin	Platynecin
	
Crotanecin	Dioxyheliotridin

Den Säureanteil nannte *Adams* in Anlehnung an den Grundkörper "Necinsäure" [2]. Die Necinsäuren weisen 5 bis 10 Kohlenstoffatome auf. Sie bilden mit den Necinen Mono- oder Diester. Die Diester wiederum können offen - bei Monocarbonsäuren - oder cyclisch - bei Dicarbonsäuren - auftreten. In Tabelle 2 sind die Kohlenstoffgerüste der Necinsäuren aufgeführt und in Tabelle 3 einige natürlich vorkommende Pyrrolizidinalkaloide mit ihren Veresterungsmöglichkeiten aufgezeigt.

Tabelle 2: Grundstruktur der Necinsäuren

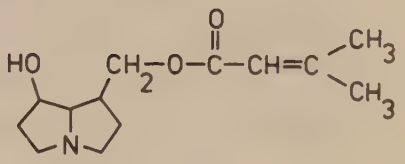
	Angelika-, Tiglinsäure
	Senecioinsäure
	Jacobin-, Jacolin-, Jacozinsäure
	Integerrinecin-, Isatinecin-, Retronecin-, Senecin-, Usaramoensinsäure
	Riddellin-, Seneciphyllin-, Spartioidinecinsäure

2) *R.Adams* und *B.L.van Duuren*, J.Am.Chem.Soc. 75, 2377 (1953)

Tabelle 3: Veresterungsmöglichkeiten der Pyrrolizidinalkaloide

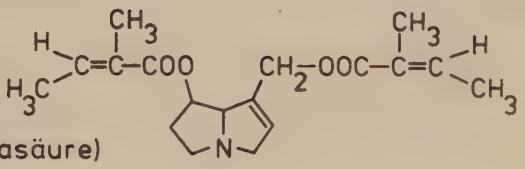
Fuchsisenecionin

(Platynecin + Senecioninsäure)



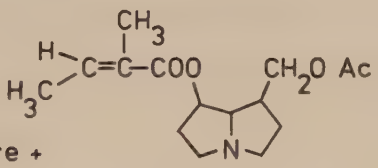
a) Asperumin

(Heliotridin + 2 Mol Angelikasäure)



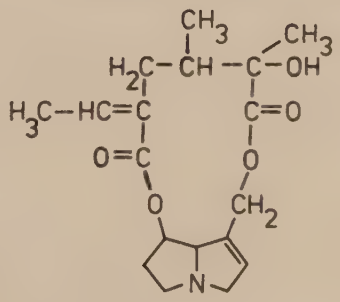
b) Brachyglottin

(Platynecin + Angelikasäure + Essigsäure)



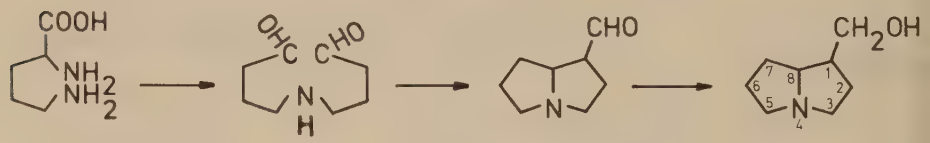
Senecionin

(Retronecin + Senecinsäure)



1.3. Biochemie der Pyrrolizidinalkaloide

Aufgrund der Biosynthese des Necins werden die Pyrrolizidinalkaloide der Ornithingruppe zugeordnet. Es werden heute zwei Biosynthesemöglichkeiten für den Pyrrolizidinring diskutiert:
Robinson [3] gelang es, unter zellmöglichen Bedingungen die Synthese des 1-Hydroxymethylpyrrolizidins durchzuführen. Die Pflanze soll dieses Necingerüst von der Aminosäure Ornithin ausgehend über die Zwischenstufe eines Iminodialdehyds bilden.

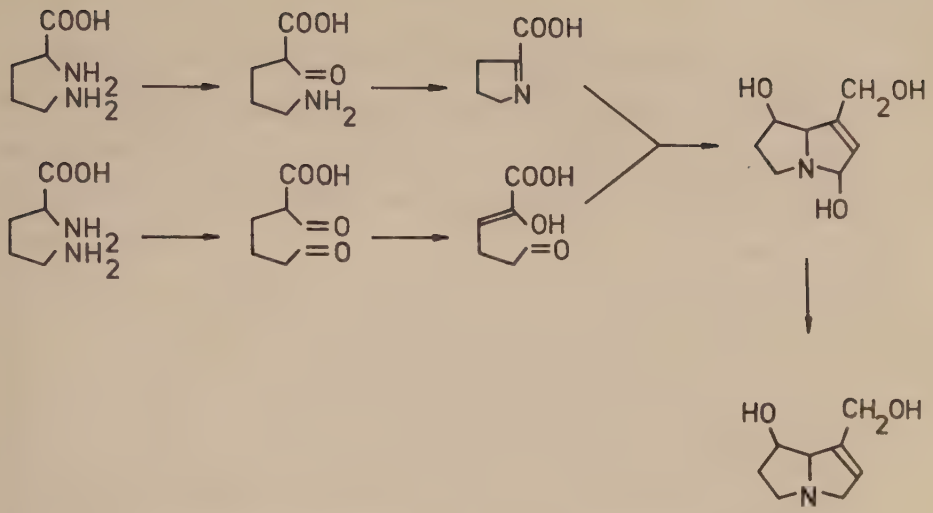


In 7-Stellung hydroxylierte Grundkörper werden aus dem entsprechenden Hydroxyornithin gebildet.
Nach *Hughes et al.* [4] konnte ein anderer Biosyntheseweg weitgehend durch ^{14}C-Radiomarkierung aufgeklärt werden. Er geht ebenfalls vom Ornithin aus. Als Zwischenprodukte werden 5-Amino-2-oxo-pentansäure und 1-Pyrrolin-2-carbonsäure diskutiert. Letztere Verbindung könnte mit der Enolform der 2,5-Dioxopentansäure, die auch aus Ornithin gebildet werden kann, zu einem Pyrrolizidinderivat weiterreagieren, aus dem z.B. Retronecin entstehen könnte.

---

3) *R.Robinson*, The structural relations of natural products, Claredon Press, Oxford, 1955, S. 10

4) *C.A.Hughes*, *R.Letcher* und *F.L.Warren*, J.Chem.Soc. 1964, 4974



Bei den Necinsäuren vermutete man anfangs, daß die Biosynthese aus Acetatbausteinen unter evtl. Einführung verschiedener C_3-Körper erfolgte. Genauere Untersuchungen wurden dann später durch ^{14}C-Radiomarkierung bei der Seneciphyllinsäure durchgeführt. Entgegen der früheren Annahme konnten die Aminosäuren Threonin und Isoleucin ebenso wie ihre Stoffwechselprodukte α-Ketobuttersäure bzw. Angelikasäure, sowie ihre Biosynthesevorstufen Asparaginsäure bzw. α-Ketobuttersäure und Pyruvat nachgewiesen werden [5].

Allgemein läßt sich sagen, daß die Necinsäuren aus verschiedenen Aminosäuren, sowie deren Biosynthesevorstufen und deren Stoffwechselprodukte in der Pflanze gebildet werden.
Die Biosynthese der Alkaloide ist ebenfalls durch ^{14}C-Radiomarkierung wahrscheinlich gemacht worden. Danach werden die Necine mit fertigen Necinsäuren verestert [6].

---

5) *D.H.G.Crount, M.H.Benn, H.Imaseki* und *T.A.Geismann*, Phytochemistry 5, 1 (1966)

6) *F.L.Warren*, Abh.Dtsch.Akad.Wiss.Berlin, Kl.Chem., Geol., Biol. 3, 571 (1966)

Bei der Synthese der cyclischen Diester tritt vermutlich eine Veresterung des Necins mit Monocarbonsäuren des Typs C_5 an der 1-Hydroxymethyl- bzw. der 7-Hydroxygruppe ein. Eine intramolekulare Kondensation der beiden Necinsäuren führt dann zu einer C_{10}-Dicarbonsäure [5,7].

1.4. Toxikologie der Pyrrolizidinalkaloide

Die toxischen Wirkungen der Pyrrolizidinalkaloide auf Tiere und Menschen sind recht mannigfaltig. Bei der Verfütterung von Crotalaria-Arten an Ratten wurden Erosionen der Lunge, verbunden mit Lungenblutungen [8] und Blutsturz [9] beobachtet. Nicht veresterte Pyrrolizidinalkaloide, die überwiegend in Crotalaria vorkommen, riefen bei Pferden pathologische Veränderungen der Speiseröhre hervor [10].

Die häufigste beschriebene Wirkung der Senecio-Arten ist jedoch die hepatotoxische. Die Literatur berichtet von endemischem Auftreten bei Weidevieh und Pferden, das durch Leberzirrhose hervorgerufen wurde, u.a. "Picton disease" in Kanada [11], "Winton disease" in Neuseeland [11], "Molteno disease" [12], "Cape Colonny disease" [13], "Schweinsberger disease" in Deutschland [11].

---

7) *C.Hughes* und *F.L.Warren*, J.Chem.Soc. 1962, 34
8) *R.Schoental*, Biochem.J. 88, 57 (1963)
9) *J.J.Lalich* und *L.A.Ehrhart*, J.Atherosoler.Res. 2, 482 (1962)
10) *R.Schoental*, Cancer Res. 28, 2237 (1968)
11) *L.B.Bull*, *C.C.J.Culvenor* und *A.T.Dick*, The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1968, S. 2
12) *W.H.Chase*, Agri.J.Cape Good Hope 25, 675 (1904)
13) *W.Robertson*, J.Comp.Pathol.Ther. 19, 97 (1906)

Bei Menschen hat man in Südafrika Lebererkrankungen, hervorgerufen durch Pyrrolizidinalkaloide, beobachtet. Diese als "bread poisoning" bezeichnete Erkrankung ist auf Verzehr von Brot, das mit Senecio jacobea verunreinigtem Getreide gebacken wurde, zurückzuführen [14].

Viele Untersuchungen sind in den letzten Jahren durchgeführt worden, um die hepatotoxische Wirkung zu ergründen. Es scheint, daß einige chemische Strukturmerkmale für die Lebertoxizität verantwortlich sind. Als wichtigste Voraussetzung wird in diesem Zusammenhang das Vorliegen einer Doppelbindung im Grundgerüst angenommen. So zeigt nach *Chen* [15] Platyphyllin, das im Gegensatz zum stark hepatotoxisch wirkenden Senecionin ein gesättigtes Pyrrolizidingerüst enthält, selbst bei letalen Dosen keine leberschädigende Wirkung. Ihm wird hingegen eine atropinartige Wirkung zugesprochen [16,17].

Die hepatotoxische Wirkungsstärke der Pyrrolizidinalkaloide ist von *Schoental* durch Tierversuche erhellt worden [18,19]. Danach wirken Diester-Alkaloide stärker als Monoester-Alkaloide. Den cyclischen Diestern schreibt *Schoental* weiterhin eine größere Toxizität zu als den offenen Diestern.

Der Säureteil selbst besitzt anscheinend keinen oder nur einen sehr geringen Effekt, gleichgültig ob er Hydroxylgruppen trägt oder Doppelbindungen enthält.

---

14) *F.C.Willmott* und *G.W.Robertson*, Lancet 2, 848 (1920)

15) *K.K.Chen*, *P.W.Harris* und *C.L.Rose*, J.Pharmacol.Exp.Ther. 68, 130 (1940)

16) *J.J.Goldenhershel*, Klin.Med. 31 (3), 56 (1943)

17) *J.J.Goldenhershel*, Am.Rev.Sov.Med. 1, 155 (1943)

18) *R.Schoental*, *M.A.Head* und *P.R.Peacock*, Br.J.Cancer 8, 458 (1954)

19) *R.Schoental*, Nature (London) 179, 361 (1957)

Durch neuere Untersuchungen konnten von *Mattocks* [20] Metaboliten der Pyrrolizidinalkaloide in der Leber, im Muskelgewebe und im Urin nachgewiesen werden. Diese Metaboliten sind höchstwahrscheinlich für die hepatotoxische Wirkung verantwortlich zu machen. Sie besitzen eine pyrrolähnliche Struktur und werden aus Alkaloiden mit einem ungesättigten Necin gebildet. Die in Abb.1 dargestellte Metabolisierung ist dafür ein Beispiel.

Das Alkaloid (I) wird hierbei in den Leberparenchymzellen zum N-Oxid (II) umgesetzt, das dann vermutlich durch Wasserabspaltung zu einem elektrophilen Pyrrolderivat (III) umgewandelt wird. Dieses reagiert seinerseits mit nucleophilen Substanzen (X^-, Y^-), wie z.B. DNA oder RNA, unter gleichzeitiger Abspaltung der anionischen Estergruppierungen (IV, VI) zu alkylierten Derivaten von X (V) bzw. Y (VII). Es verwundert deshalb auch nicht, daß die Pyrrolizidinalkaloide carcinogene, mutagene [21-24] und teratogene [25,26] Wirkungen besitzen.

---

20) *R.A.Mattocks*, Nature (London) 217, 723 (1968)
21) *A.M.Clark*, Nature (London) 183, 731 (1959)
22) *A.M.Clark*, Z.Vererbungsl. 91, 74 (1960)
23) *C.M.Cook* und *A.C.F.Holt*, J.Genet. 59, 273 (1966)
24) *S.Avanzi*, Caryologia 14, 251 (1961)
25) *C.R.Green* und *G.S.Christie*, Brit.J.Exp.Pathol. 42, 369 (1961)
26) *A.E.Sundareson*, J.Pathol.Bacteriol. 54, 289 (1942)

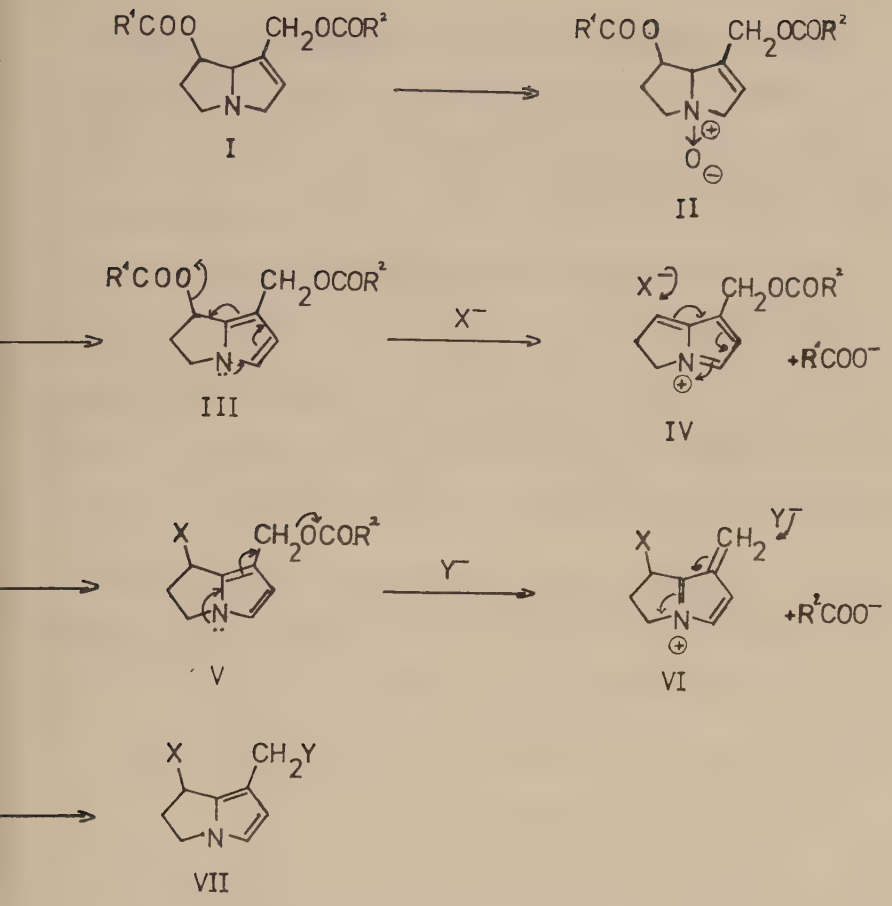


Abb.1. Metabolisierung von Pyrrolizidinalkaloiden nach *Mattocks*[20]

2. PROBLEMSTELLUNG

Die bekannt gewordenen Nebenwirkungen synthetischer Arzneimittel führen zu einer steigenden Verunsicherung vieler Menschen, wodurch der Trend zur Selbstmedikation mit Heilpflanzen begünstigt wird. Da man bei Heilpflanzen nur mit Heil- und nicht mit Nebenwirkungen rechnet, werden diese bzw. deren Inhaltsstoffe oftmals über einen längeren Zeitraum ohne jegliche Kontrolle in Form von Tees, Tropfen u.a. Zubereitungen eingenommen. Durch die Langzeiteinnahme ist bei einigen Drogen aber zu befürchten, daß die Gesundheitsrisiken größer sind als ihre Heilwirkung. Diese Befürchtung trifft vornehmlich auf Arzneipflanzen zu, die noch nicht auf ihre Inhaltsstoffe und deren Wirkung bzw. Nebenwirkung hin gründlich erforscht sind.

Zu den in vielen Arzneimitteln vorkommenden Drogen gehören auch Arten aus der Familie der Asteraceen und Boraginaceen. So werden aus der Gattung Senecio die Arten Senecio fuchsii [27,28] und Senecio aureus [29] in der Gynäkologie als Hämostypticum auch heute noch verwendet. Beide Pflanzen enthalten als Inhaltsstoffe u.a. toxische Pyrrolizidinalkaloide [30,32].

Senecio jacobea und Senecio vulgaris werden äußerlich als Wundheilmittel und als Gurgelwasser eingesetzt. Innerlich werden sie ähnlich wie Senecio fuchsii angewendet [31,32]. Als Inhaltsstoffe

---

27) *E.Röder* und *H.Wiedenfeld*, Phytochemistry 16, 1462 (1977)

28) *H.Braun*, Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1978, S. 201

29) *W.Spaich*, Moderne Phytotherapie, Haug Verlag, Heidelberg, 1978, S. 332

30) Bundesgesundheitsblatt 3, 141 (1960)

31) *A.Müller*, Heil- und Gewürzpflanzen 7, 7 (1924)

32) *H.Funke*, Naturheilpraxis 3, 253 (1978)

sind auch hier mehrere Pyrrolizidinalkaloide identifiziert worden [33].

In Tussilago farfara wurde von *Culvenor und Mitarbb.* [34] das Pyrrolizidinalkaloid Senkirkin gefunden. Da dieses Alkaloid nach *Schoental* [35] hepatocancerogen wirkt, wurde die pulverisierte Droge an Ratten verfüttert. Hierbei konnten Lebersarkome festgestellt werden [36].

Die Boraginacee Pulmonaria officinalis wird ebenfalls in verschiedenen Hustenmitteln verwendet. Auch hier scheinen Pyrrolizidinalkaloide als Begleitstoffe vorzuliegen [37].

Eine ähnliche Situation liegt bei der Asteracee Senecio doronicum vor. Diese wird als Volksheilmittel in den Alpenländern gebraucht. Die oberirdischen Teile werden dort gegen Asthma verabreicht [38].

Über ihre Inhaltsstoffe war bislang noch nichts bekannt. Da aber angenommen werden mußte, daß sie toxische Pyrrolizidinalkaloide enthält, erschien die Bearbeitung dieser Droge geboten.

---

33) *L.B.Bull, C.C.J.Culvenor* und *A.T.Dick*, The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1968, S. 234

34) *C.C.J.Culvenor, J.A.Edgar, L.W.Smith* und *J.Hirono*, Aust.J. Chem. 29, 230 (1976)

35) *R.Schoental*, Nature 227, 401 (1970)

36) *I.Hirono, H.Mori* und *C.C.J.Culvenor*, Gann 67, 125 (1976)

37) *E.Röder*, unveröffentlichte Ergebnisse

38) *A.Müller*, Heil- und Gewürzpflanzen 7, 15 (1924)

3. BOTANISCHE BESCHREIBUNG

Die Asteracee Senecio doronicum L. - Gemswurzkreuzkraut - ist eine typische Gebirgspflanze, die auch auf nährstoffarmen Böden anzutreffen ist. Sie wächst auf steinigen, sonnigen Hängen ab etwa 1000 m Höhe bis zur nivalen Stufe. Bevorzugt gedeiht sie auf Kalk- und auf Urgestein um 2000 m Höhe. Sie ist im Alpengebiet, aber auch im Mittel- und Nordspanischen Hochgebirge, den Pyrenäen und dem Französischen Mittelgebirge verbreitet.
Senecio doronicum [39,40] ist eine ausdauernde, 20 bis 60 cm hohe Pflanze, die in Gruppen zu finden ist. Ihre Laubblätter sind ledrig, wollig-behaart und gezähnt; die unteren sind in den Stiel zusammengezogen, während sie nach oben hin immer mehr den Stengel umfassen. Ebenso treten Blattformveränderungen von elliptisch oder eilanzettlich nach eiförmig, lineallanzettlich auf. Die 4 bis 6 cm breiten Blütenköpfe sind lang gestielt. Die glockige, 1-1.5 cm lange Blütenhülle ist von kürzeren Außenhüllblättern umgeben. Die zahlreichen, dunklen Hüllblätter sind linealförmig und wollig behaart. Die dotter- bis orangegelben Blüten besitzen zahlreiche, auf der Unterseite behaarte Zungenblüten von fast 2 cm Länge und 0.5 cm Breite. Die Früchte sind ca. 0.5 cm lang, längsriefig und kahl. Der Pappus ist über 1 cm lang. Die Blütezeit ist im Juli und August.

---

39) *G.Hegi*, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. VI, 2.Hälfte, 751

40) Flora Europaea, Bd. IV, 197 (1976-77)

4. BESCHAFFUNG DES DROGENMATERIALS

Wegen der größeren Vorkommen aber auch der Besonderheit der Böden wegen wurde die Senecio doronicum an zwei Standorten im subalpinen Bereich gesammelt: einmal am Mte. Baldo, einem überwiegend aus Kalkgestein bestehenden Gebirgszug in unmittelbarer Nähe des Gardasees, dann im Ötztal bei Vent, wo saures Urgestein vorliegt.

Die Untersuchungen sollten neben der Aufklärung der Alkaloidinhaltsstoffe zeigen, ob sich die unterschiedlichen klimatischen und geobotanischen Bedingungen beider Standorte auf das qualitative und quantitative Verteilungsmuster der Alkaloide in der Pflanze auswirken.
Die oberirdischen Teile von Senecio doronicum wurden während der Blütezeit 1977 in Vent und 1978 in Vent und am Mte. Baldo gesammelt. Die Droge wird luftgetrocknet und pulverisiert.

5. EXTRAKTION UND ISOLIERUNG

5.1. Nachweis der Pyrrolizidinalkaloide

Um festzustellen, ob Senecio doronicum Pyrrolizidinalkaloide enthält, wird die Droge mit Methanol erschöpfend extrahiert. Nach vollständigem Einengen des Extraktes am Rotationsverdampfer wird ein teerartiger Rückstand erhalten, der sich nach der elotropen Reihe in allen organischen Lösungsmitteln löst. Die Ether-, Petrolether- und Dichlormethanlösung werden daraufhin dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator untersucht. Als Fließmittelgemisch wird Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (25%) im Verhältnis 85:14:1 verwendet. Die drei Chromatogramme zeigen das gleiche Ergebnis. Es sind unter UV-Licht zwei große, dicht beieinanderliegende Flecken und mehrere, sehr viel kleinere Flecken sichtbar. Durch Anfärben mit Dragendorff's Reagenz können sie als Alkaloide identifiziert werden. Da durch diese Farbreaktion allgemein Alkaloide detektiert werden, wird zum speziellen Nachweis von Pyrrolizidinalkaloiden eine Methode angewendet, die erstmals von *Dann* [41] beschrieben und von *Mattocks* [42] für die DC variiert wurde.

Die entwickelten DC-Platten werden mit Wasserstoffperoxid (30%), Acetanhydrid und Ehrlich's Reagenz besprüht und nach jeder Behandlung 15 Minuten lang auf 120°C erhitzt. Dadurch werden die Pyrrolizidine in ihre N-Oxide überführt. Diese lagern sich vermutlich durch Acetylierung und anschließender Essigsäure-Abspaltung in die entsprechenden Pyrrolderivate um, die nach einer Art

---

41) *A.T.Dann*, Nature (London) 186, 1015 (1960)

42) *A.R.Mattocks*, J.Chromatogr. 27, 505 (1967)

Van Urk-Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd einen blauen bis violetten Farbstoff bilden. Abb.2 zeigt den vermuteten Reaktionsverlauf. Gesättigte Pyrrolizidinalkaloide reagieren hierbei zu einem rosa-violetten, ungesättigte dagegen zu einem dunkelblauen Farbstoff.

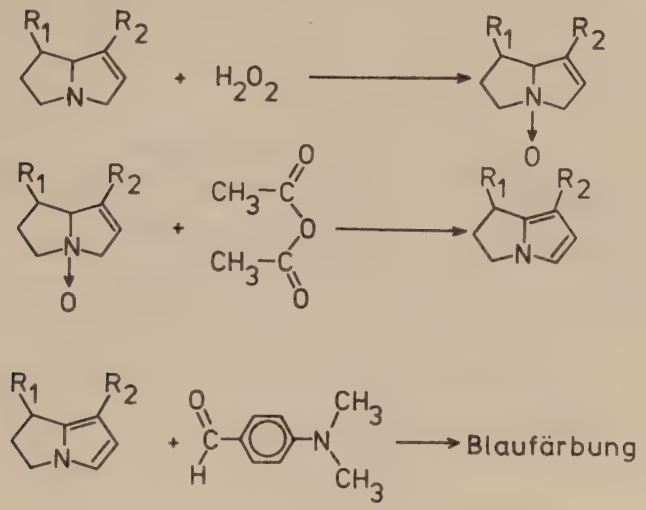


Abb.2. Reaktionsschema der *Dann*'schen Probe

In Abb.3 ist das Ergebnis einer DC-Analyse wiedergegeben. Die beiden Flecken mit den R_f-Werten 0.49 und 0.31 sind intensiv dunkelblau bzw. violett gefärbt, die kleineren zeigen hingegen nur eine schwache Färbung. Oberhalb der Startlinie ziehen sich blaue Farbzonen hoch, die auf N-Oxide schließen lassen. Diese entstehen unter Lufteinwirkung, so daß eine schonende Behandlung unter N_2-Atmosphäre angezeigt ist.

Diese Voruntersuchungen zeigen, daß in der Asteracee Senecio doronicum Alkaloide vorhanden sind, die zur Stoffklasse der Pyrrolizidine gehören.

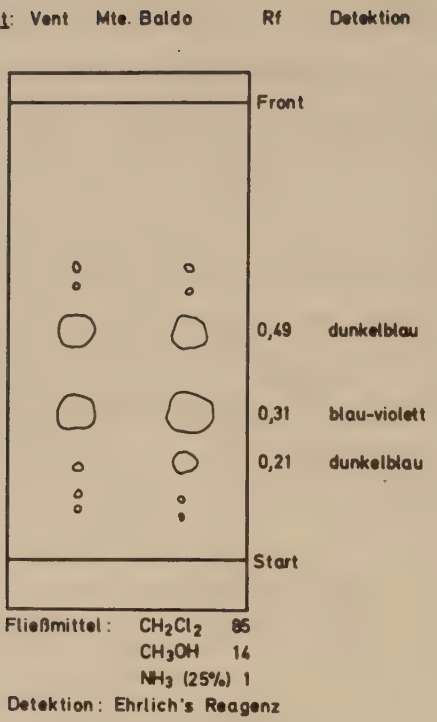


Abb.3. DC-Platte von Senecio doronicum

5.2. Extraktion der Pyrrolizidinalkaloide

Die getrocknete, pulverisierte Droge wird in einer Soxhlet-Apparatur mit Methanol erschöpfend extrahiert. Der eingedampfte teerartige Rückstand wird nach der von *Wiedenfeld* [43] beschriebenen, für Pyrrolizidinalkaloide schonenden Methode, mit 2.5%iger Salzsäure aufgenommen und das Chlorophyll mit Ether abgetrennt. Die

43) *H.Wiedenfeld*, Isolierung, Strukturaufklärung und Partialsynthese eines Alkaloids aus Senecio fuchsii, Diss. Bonn, 1976

saure Wasserphase wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird nochmals mit Salzsäure ausgeschüttelt. Diese salzsaure Phase wird ammoniakalisiert und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer bleibt Alkaloid-Rohextrakt zurück.

5.3. Trennung und Isolierung der Pyrrolizidinalkaloide

Der durch Extraktion gewonnene Alkaloid-Rohextrakt soll chromatographisch im präparativen Maßstab in seine Einzelkomponenten zerlegt werden. Anhand der Voruntersuchungen im Kap. 5.1. konnte eine Trennung der beiden Hauptalkaloide durch DC erreicht werden. Zur Auftrennung im präparativen Maßstab wird die Säulenchromatographie an Kieselgel versucht.

5.3.1. Säulenchromatographie

Eine 1 m lange und 3 cm breite Glassäule wird mit Kieselgel nach dem üblichen Verfahren gefüllt. Nach dem Aufbringen des Rohextraktes auf die Säule wird mit Dichlormethan eluiert. Da hierbei im Eluat kein Alkaloid nachgewiesen werden konnte, wird das Fließmittel durch 2%igen Methanolzusatz polarer gemacht. Nach Erhöhung der polaren Komponente bis auf 5% werden die Hauptalkaloide nur teilweise voneinander getrennt und mit Begleitstoffen stark verunreinigt aufgefangen. Bei einem 7%igen Methanolzusatz können im Eluat keine Alkaoide mehr nachgewiesen werden.

Da die beiden Hauptalkaloide nur bei einem 5%igen Methanolzusatz eluiert werden, muß angenommen werden, daß der größte Teil auf der Säule verbleibt.

5.3.2. Dünnschichtchromatographie

In Anlehnung an den qualitativen DC-Nachweis wird deshalb die Dünnschichtchromatographie in präparativem Maßstab durchgeführt. Wegen der guten Trennschärfe finden Kieselgel-Platten mit einer Schichtdicke von 0.25 mm Verwendung. Bei Erhöhung des Adsorbens auf 0.4 und 0.5 mm verschlechtert sich die Auftrennung. Die optimale Auftragsmenge pro DC-Platte beträgt ca. 50 mg Rohextrakt bei einer Auftragsbreite von 18 cm. In Form einer 10%igen Lösung werden jeweils 500 µl Extrakt auf die Platte gebracht. Um die Trennleistung zu erhöhen, wird die polare Komponente in dem unter Kap. 5.1. genannten Fließmittelgemisch - $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3$ (25%) = 85:14:1 - variiert. Es werden Laufmittel mit 12-, 16- und 18%igem Methanolzusatz eingesetzt. Gegenüber dem ursprünglichen Fließmittelgemisch wird jedoch keine Verbesserung erzielt.

Die entwickelten Platten werden unter UV-Licht markiert. Die Zonen mit den R_f-Werten 0.49 und 0.31 werden ausgekratzt und dreimal mit Methanol extrahiert. Nach dem Einengen bleibt in beiden Fällen ein schmutziges, gelb gefärbtes Öl zurück, das weder durch Eluieren über eine neutrale Aluminiumoxid-Säule noch durch Filtrieren über Aktivkohle gereinigt werden kann. Die Versuche einer direkten Kristallisation aus Aceton, Petrolether/Dichlormethan-, Ether/Dichlormethan- und Petrolether/Methanol-Gemischen bleiben

ohne Erfolg. Ebenso gelingt es nicht, die Alkaloide in ethanolischer Lösung durch Einleiten von HCl-Gas oder durch Zusatz von Pikrinsäure als Salze zu fällen. Die Zugabe komplexartig angreifender Säuren wie Zitronen- oder Weinsäure führt ebenfalls nicht zum Ziel. In einem Aceton/Petrolether-Gemisch (1:9) fallen die Alkaloide schließlich in Form ihrer freien Basen amorph an. Hieraus werden mit Aceton kristalline Produkte erhalten.

Die Substanz A mit dem R_f-Wert 0.49 schmilzt bei 124-127°C unter Zersetzung. Ihre optische Drehung, deren Bestimmung in Abb.4 dargestellt ist, beträgt in Ethanol $[\alpha]_D^{20} = +123.4^\circ$.

Substanz B mit dem R_f-Wert 0.31 weist einen Schmelzpunkt von 112-113°C auf. Beim Abkühlen kristallisiert sie wieder aus. Sie zeigt in Ethanol eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -74.2^\circ$. Abb.5 gibt die Meßergebnisse wieder.

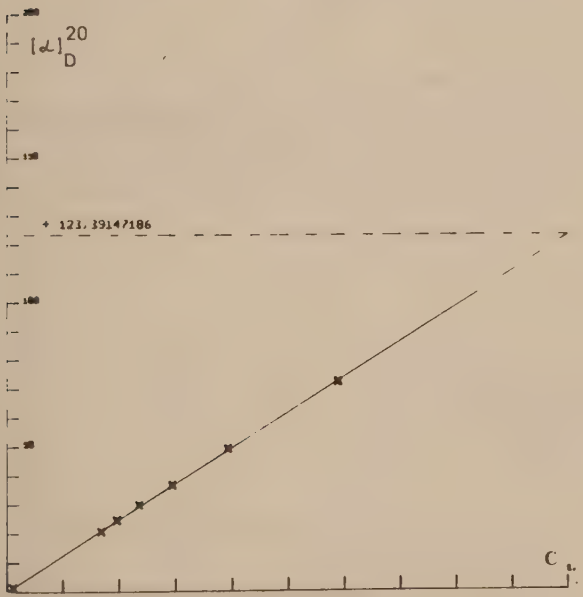


Abb.4. Spezifische Drehung von Alkaloid A

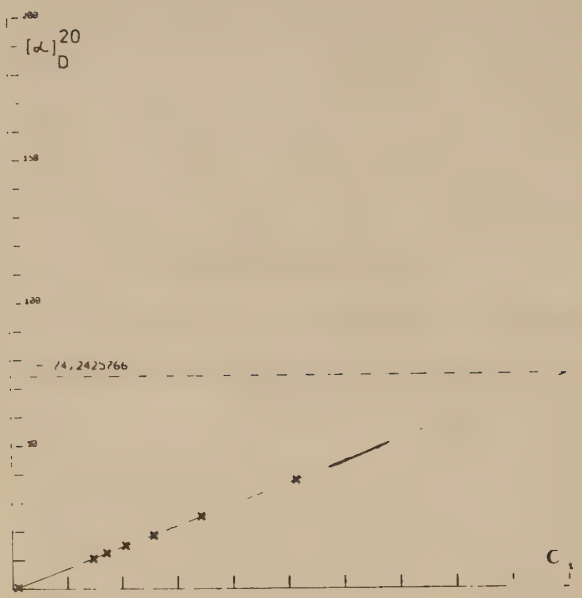


Abb.5. Spezifische Drehung von Alkaloid B

Beide Alkaloide sind in Wasser nicht, in Petrolether wenig und in Aceton beim Erhitzen gut löslich. Sehr gute Löslichkeit zeigen sie in Methanol, Ethanol, Chloroform und Dichlormethan.

6. STRUKTURAUFKLÄRUNG

Die Strukturen der isolierten Alkaloide werden durch IR-, Massen-, ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren aufgeklärt.

Um die freien Aminoalkohole und Necinsäuren zu erhalten, werden die Esteralkaloide mit einer 10%igen $Ba(OH)_2$-Lösung zwei Stunden lang unter Rückfluß und Stickstoffbegasung verseift. Die Necine werden mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit Salzsäure werden die Säuren ebenfalls mit Dichlormethan extrahiert.

Die Necinsäuren können aus Aceton/Petrolether kristallin erhalten werden. Die Strukturen werden spektroskopisch ermittelt.

Die gelblich gefärbten, öligen Necine können durch keine der im vorigen Kapitel erwähnten Methode rein erhalten werden. Hiervon werden nur Massenspektren angefertigt.

6.1. Alkaloid A : Doronenin

Das IR-Spektrum von Alkaloid A ist in Abb.6 wiedergegeben.

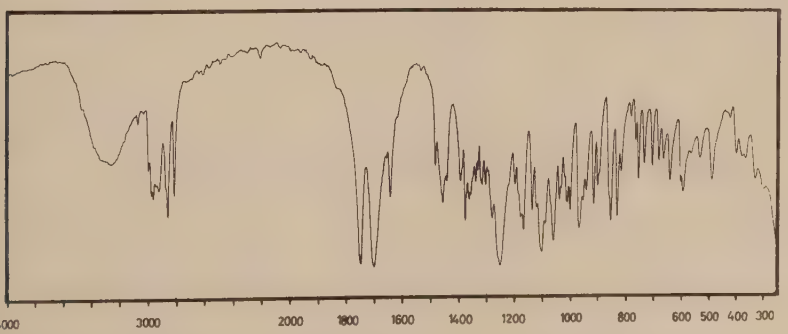


Abb.6. IR-Spektrum von Alkaloid A

Bei 3300 cm^{-1} ist die Absorption für die OH-Streckschwingung eines Alkohols erkennbar. Charakteristische Banden treten bei 1742 und 1718 cm^{-1} auf. Hierbei handelt es sich um die C=O-Valenzschwingung eines gesättigten und eines α,β-ungesättigten Esters. Die Absorption bei 1650 cm^{-1} ist einer unsymmetrisch substituierten Doppelbindung zuzuordnen.

Das in Abb.7 wiedergegebene Massenspektrum weist einen Molekülpeak von $M^{\oplus}$ 335 (6.4%) auf, dem die Summenformel $C_{18}H_{25}NO_5$ zugeordnet werden kann. Weitere charakteristische Peaks treten auf bei m/e 291 (17.0), 138 (71.1), 137 (34.4), 136 (100.0), 121 (81.6), 120 (90.3), 119 (88.3), 95 (67.7), 94 (64.6), 93 (88.5) und 80 (24.9). Diese Fragmentierung ist bezeichnend für Retronecin oder eines seiner Isomeren.

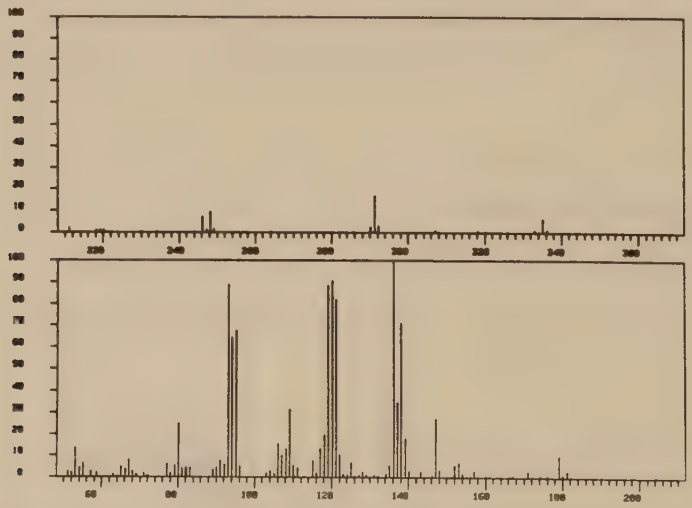


Abb.7. Massenspektrum von Alkaloid A

Die Hauptzerfallsreihen sind aus den Abb. 8a-c ersichtlich.

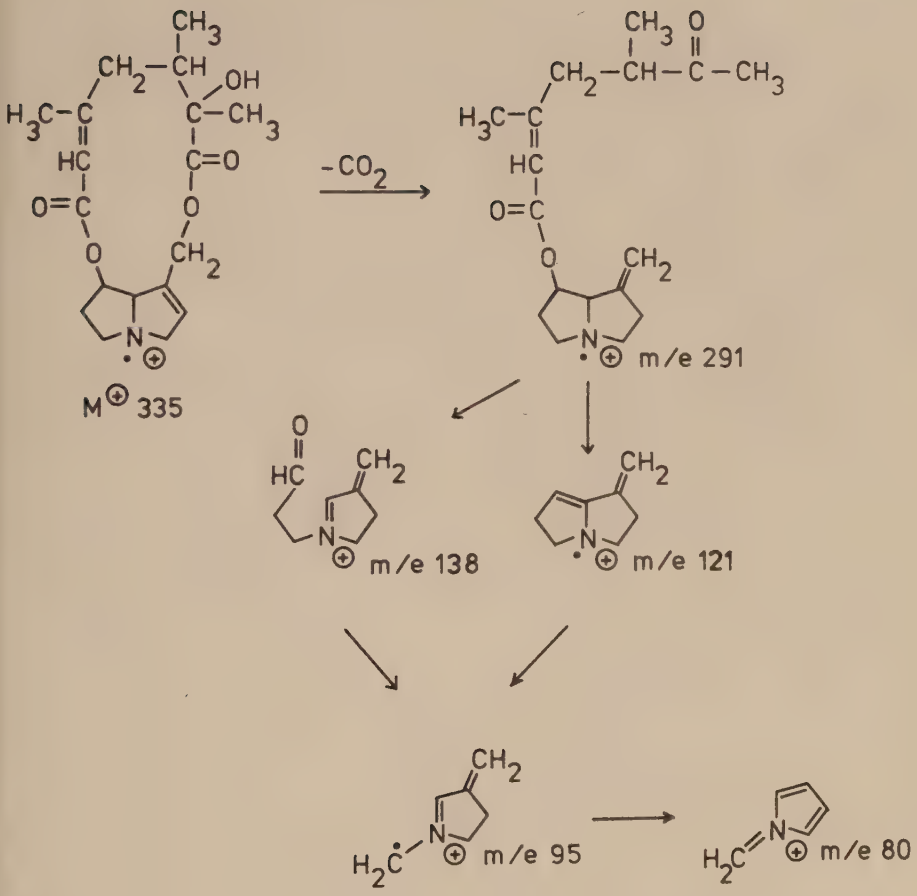


Abb.8a. Zerfallsreihe I von Alkaloid A

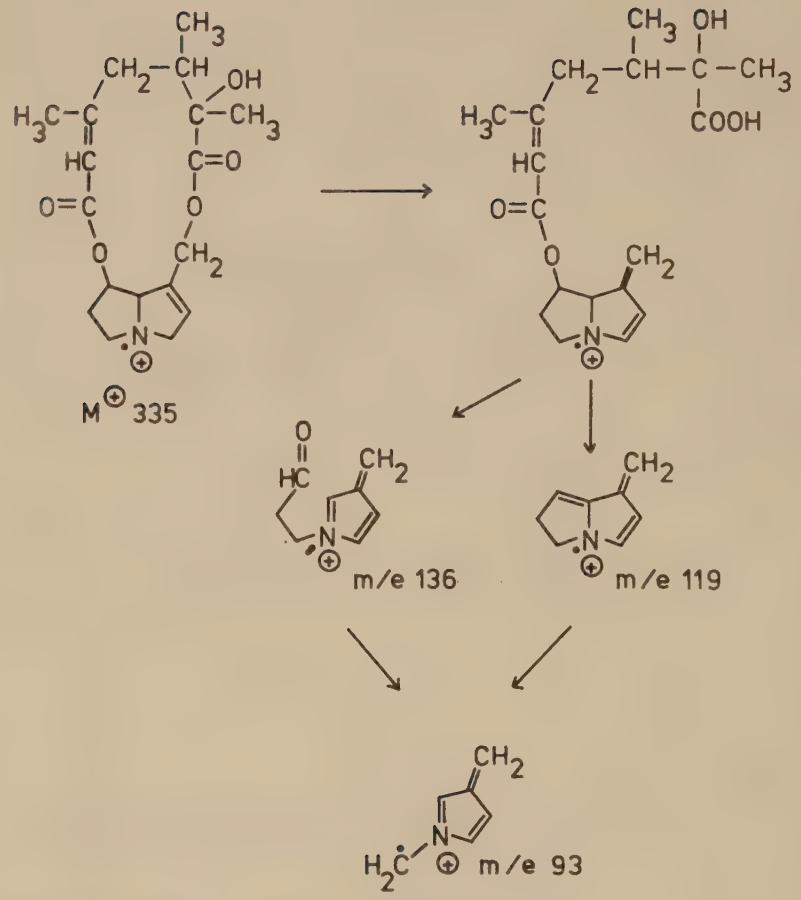


Abb.8b. Zerfallsreihe II von Alkaloid A

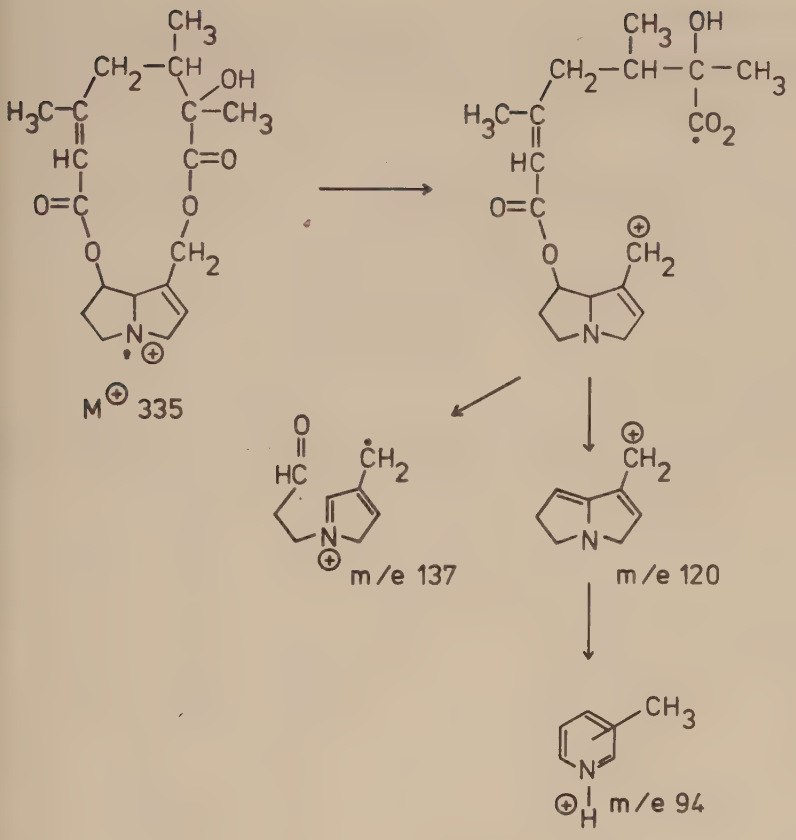


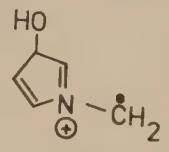
Abb.8c. Zerfallsreihe III von Alkaloid A

Das Ion m/e 293 beweist die dargestellte Art der Esterverknüpfung C_9-C_{10}-C_{11}, da es nach Umlagerung und anschließender CO_2-Abspaltung entstanden sein muß.

Bei allen Zerfallsreihen tritt eine Spaltung der Bindung C_7-C_8 des Necins ein, die u.a. durch das Auftreten der Ionen m/e 95 und 93 in den Zerfallsreihen I und II bewiesen wird. Es wäre je-

doch auch denkbar, daß die zweite, ebenfalls in α-Stellung zum ladungstragenden Stickstoff angeordnete, aktivierte Bindung C_1-C_2 des Necins gespalten würde. Die weitere Fragmentierung der Bindung C_2-C_3 müßte dann zu dem Ion m/e 97 führen [44]. Dieses Fragment fehlt aber im vorliegenden Spektrum.

m/e 97



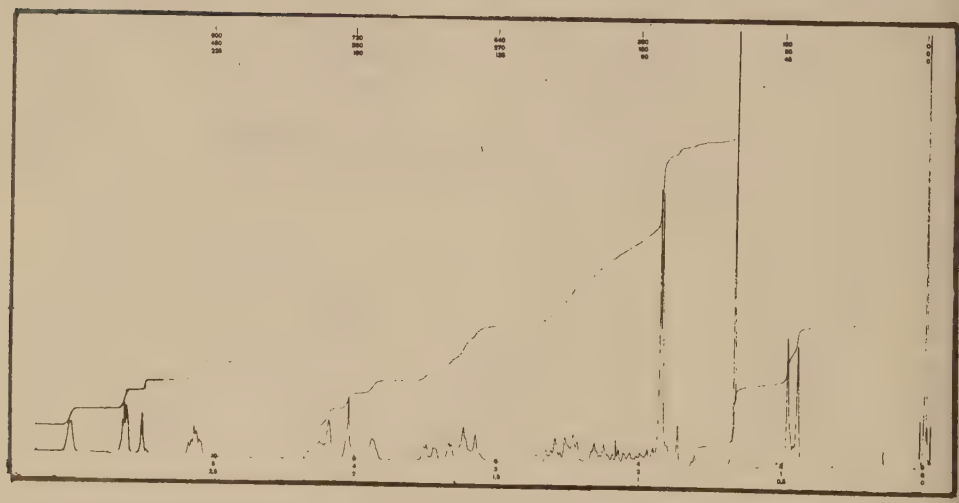


Abb.9. ^{1}H-NMR-Spektrum von Alkaloid A

Abb.9 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum von Alkaloid A.
Die Zuordnung der Protonen, besonders im Necin, erweist sich als sehr schwierig, da diese durch viele interne Kopplungen Multipletts ausbilden. Die Interpretation wird zusätzlich erschwert durch das Auftreten von downfield- und upfield-Signalen der Me-

44) *H.Budzikiewicz*, Fortschritte der Massenspektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim, 3, 229 (1975)

thylenprotonen am C_3, C_5, C_6, C_9 und C_{13}. Diese sind aufgrund der Ringstruktur zwar chemisch,nicht aber magnetisch äquivalent. Eine exakte Zuordnung ist aber durch Einstrahlexperimente möglich.

Das olefinische C_2-Proton erscheint als Multiplett bei 6.13 ppm. Die Protonen am C_3 und C_5 weisen durch den vicinalen, elektronegativ wirkenden Stickstoff eine tiefere Feldverschiebung als die Protonen am C_6 auf.

Die Doppelbindung zwischen C_1-C_2 verstärkt diesen Effekt auf die C_3-Protonen und bewirkt ferner die Bildung eines Quartdubletts mit den Kopplungskonstanten J= 50 Hz und J= 15 Hz.

Die über 2.0 ppm liegenden Werte für die Protonen am C_6 lassen vermuten, daß es sich bei dem Necin um Retronecin und nicht um sein Diastereomeres, das Heliotridin, handelt [45].

Die Signale der beiden Protonen am C_9 sind durch die vicinale Stellung der Doppelbindung und der Estergruppierung noch weiter ins tiefe Feld, nach 5.66 bzw. 4.11 ppm, verschoben. Die Kopplung miteinander unter Bildung eines AB-Systems beweist, daß sie nicht äquivalent sind und die benachbarten C-Atome keine Protonen tragen. Die geminale Kopplung beträgt J= 13 Hz, die chemische Verschiebung J= 130 Hz. Der letzte Wert läßt auf einen Makrocyclus mit 12 Kohlenstoffatomen schließen [45].

Die allylische Struktur C_{15}-C_{14}-C_{19} wird durch das Dublett der C_{19}-Methylgruppe bei 1.84 ppm mit der Kopplungskonstante J= 1.5 Hz und das durch Fernkopplungen als Multiplett auftretende Signal für das C_{15}-Methinproton bei 5.65 ppm bewiesen.

Ferner wäre denkbar, daß das Methinproton am C_{14} sitzt. Eine che-

---

45) *C.C.J.Culvenor* und *W.G.Woods*, Aust.J.Chem. 18, 1625 (1965)

mische Verschiebung um 6.5 ppm wäre dann allerdings wahrscheinlicher. Auch Entkopplungsexperimente können diese Interpretation nicht erhärten. So ist z.B. beim Einstrahlexperiment auf das C_7-Methinproton das Signal für die C_{19}-Methylgruppe nur noch leicht aufgesplittet, während das C_{15}-Proton stark vereinfacht erscheint. Umgekehrt werden beim Entkoppeln des C_{15}-Protons die Fernkopplungen zum C_7-Proton und zur C_{13}-Methylengruppe unterbrochen und die allylische Kopplung zur C_{19}-Methylgruppe durch die Bildung eines Singuletts aufgehoben.

Die C_{18}-Methylgruppe mit der Kopplungskonstante J= 6.5 Hz, die für Methylgruppen am tertiären Stickstoff charakteristisch ist, tritt bei 0.93 ppm auf.

Die C_{17}-Methylgruppe am quartären Kohlenstoff erscheint bei 1.32 ppm als Singulett.

Durch Austausch mit D_2O kann der Peak bei 3.19 ppm der OH-Gruppe zugeordnet werden.

Die Protonen am C_7 und C_8 werden durch gegenseitiges Entkoppeln zugeordnet.

Durch Einstrahlen auf die C_{18}-Methylgruppe wird das Signal für das C_{12}-Methinproton vereinfacht.

Die Daten des ^{1}H-NMR-Spektrums sind in Tab.4 aufgeführt.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum bestätigt die Aussagen bzgl. der Struktur. Die Aufnahme einer off-resonance-Entkopplung zeigt je 5 quartäre, tertiäre und sekundäre, sowie 3 primäre C-Atome. Das Spektrum ist in Abb.10 und seine Daten in Tab. 5 wiedergegeben.

Ähnlich wie beim ^{1}H-NMR-Spektrum verursacht der elektronegative Stickstoff eine Verschiebung der C_3- und C_5-Signale ins tiefere

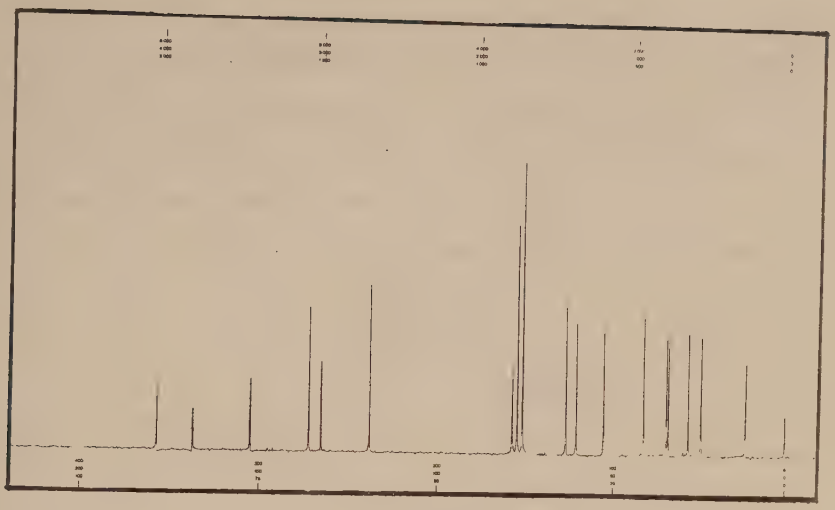


Abb.10. ^{13}C-NMR-Spektrum von Alkaloid A

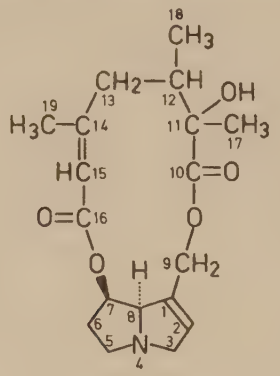
Feld gegenüber dem C_6-Signal. Durch die vicinale Doppelbindung zwischen C_1-C_2 wird dieser Effekt auf C_3 etwas verstärkt. Auf C_1 und C_2 bewirkt diese Doppelbindung hingegen eine chemische Verschiebung von +100 ppm. Entsprechend ist die Lage für C_{14} und C_{15} bei 151.8 bzw. 118.5 ppm durch die olefinische Struktur gekennzeichnet. Die trans-Stellung der C_{19}-Methylgruppe zum C_{15}-Methinproton zeigt sich durch den nach tieferem Feld verschobenen Wert von 28.3 ppm für die Methylgruppe [46].
Aufgrund der höchsten Elektronendichte sind die beiden Esterkohlenstoffe durch die größte Verschiebung charakterisiert.

Wie aus den spektroskopischen Daten zu ersehen ist, kommt dem Säureteil die Struktur einer 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure zu, die mit dem Retronecin einen Diester bildet.

---

46) *E.Breitmaier* und *G.Bauer*, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Verlag Georg Thieme, Stuttgart, 1977, S. 58

Nach den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse [47] ergibt sich für dieses Alkaloid die absolute Konfiguration (1aR, 6bR, 10R, 11R)-9,15-Dioxo-10-hydroxy-10,11,13-trimethyl-1a,2,3,6b-tetrahydro-5H-pyrrolizino[1a,6b,6a-b,c]-1,8-dioxa-cis-13-cyclotridecen. Dieses Alkaloid ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Ihm wurde der Name Doronenin gegeben.



Doronenin

Tab.4. ^{1}H-NMR-Daten von Alkaloid A

C-Atom	ppm [δ]	J [Hz]	C-Atom	ppm [δ]	J [Hz]
1	-		10	-	
2	6.13 (m)		11	3.19 (s)	(OH-Gruppe)
3	3.97 (qd)	50	12	2.19 (m)	
	3.42	15	13	2.65 (d)	
5	3.23 (d)			1.96 (m)	
	2.49 (m)		14	-	
6	2.29 (d)		15	5.65 (m)	
	2.10 (m)		16	-	
7	5.14 (m)		17	1.32 (s)	
8	4.25 (m)		18	0.93 (d)	6.5
9	5.56 (dd)	AB= 130			
	4.11	AB= 13	19	1.84 (d)	1.5

47) *A.Kirfel, H.Wiedenfeld, G.Will* und *E.Röder*, unveröffentlichte Ergebnisse

Tab.5. ^{13}C-NMR-Daten von Alkaloid A

C-Atom	ppm [δ]	Bindungs-multiplizität	C-Atom	ppm [δ]	Bindungsmul-tiplizität
1	132.0	C=C<	10	177.7	C-COOR
2	135.4	C=CH-	11	75.7	C-C<
3	63.4	C-CH_2-N	12	34.6	C-CH<
5	52.6	C-CH_2-N	13	41.1	C-CH_2-
6	34.1	C-CH_2-	14	151.8	C=C<
7	77.1	C-CH<-O	15	118.5	C=CH-
8	75.7	C-CH<-N	16	167.7	C-COOR
9	60.5	C-CH_2-O	17	24.6	C-CH_3
			18	11.7	C-CH_3
			19	28.3	C-CH_3

6.2. Alkaloid B: Bulgarsenin

Im IR-Spektrum treten die für Doronenin aufgeführten signifikanten Banden in gleicher Weise auf. Das Spektrum ist in Abb.11 dargestellt.

Das Massenspektrum, das aus Abb.12 ersichtlich ist, ergibt einen Molekülpeak von $M^{\oplus}$ 337 (4.42 %), dem die Summenformel $C_{18}H_{27}NO_5$ zugeordnet werden kann. Charakteristische Peaks treten auf bei m/e 293 (3.8), 211 (35.3), 180 (30.8), 140 (100.0), 139 (16.1), 138 (88.4), 123 (63.4), 122 (89.2), 121 (14.9), 97 (4.7), 96 (39.0), 95 (18.7) und 82 (94.9). Wie die Fragmentierung zeigt,

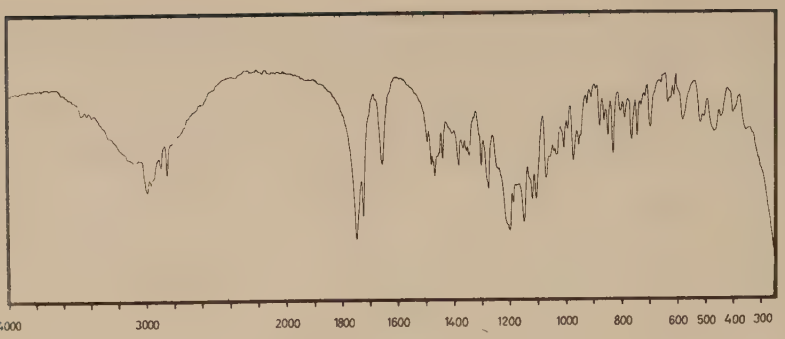


Abb.11. IR-Spektrum von Alkaloid B

handelt es sich bei dem Aminoalkohol um ein gesättigtes Pyrrolizidinalkaloid vom Typ des Platynecins. Das Alkaloid weist Zerfallsreihen auf, die denen des Doronenins analog sind. Die Art der Esterverknüpfung C_9-C_{10}-C_{11} ist durch das Ion m/e 291, das durch Umlagerung und anschließender CO_2-Eliminierung entstanden sein muß, festgelegt.

Die Fragmentierungsschemata sind in den Abb.13a-c wiedergegeben,.

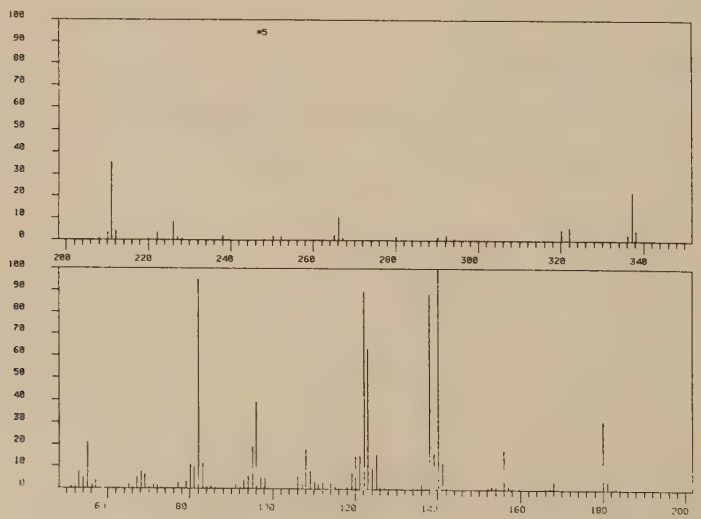


Abb.12. Massenspektrum von Alkaloid B

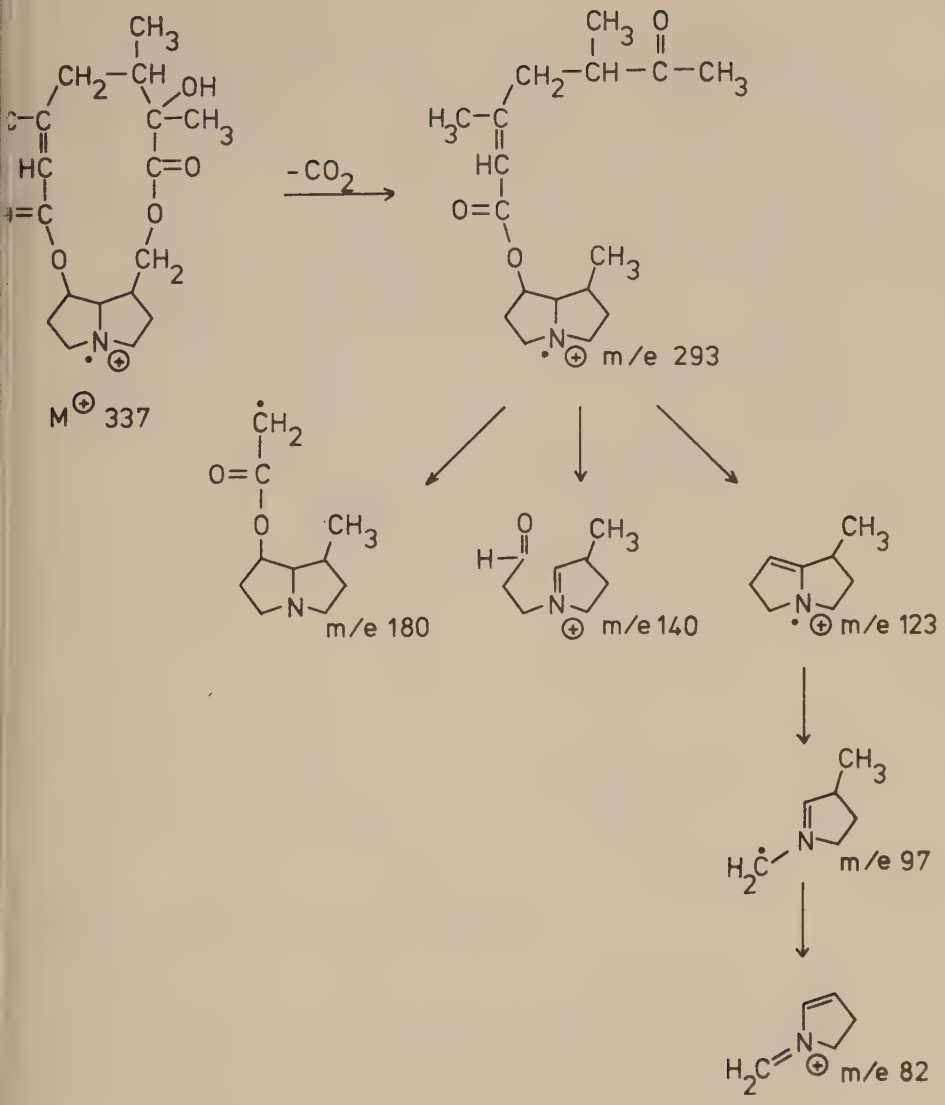


Abb.13a. Zerfallsreihe I von Alkaloid B

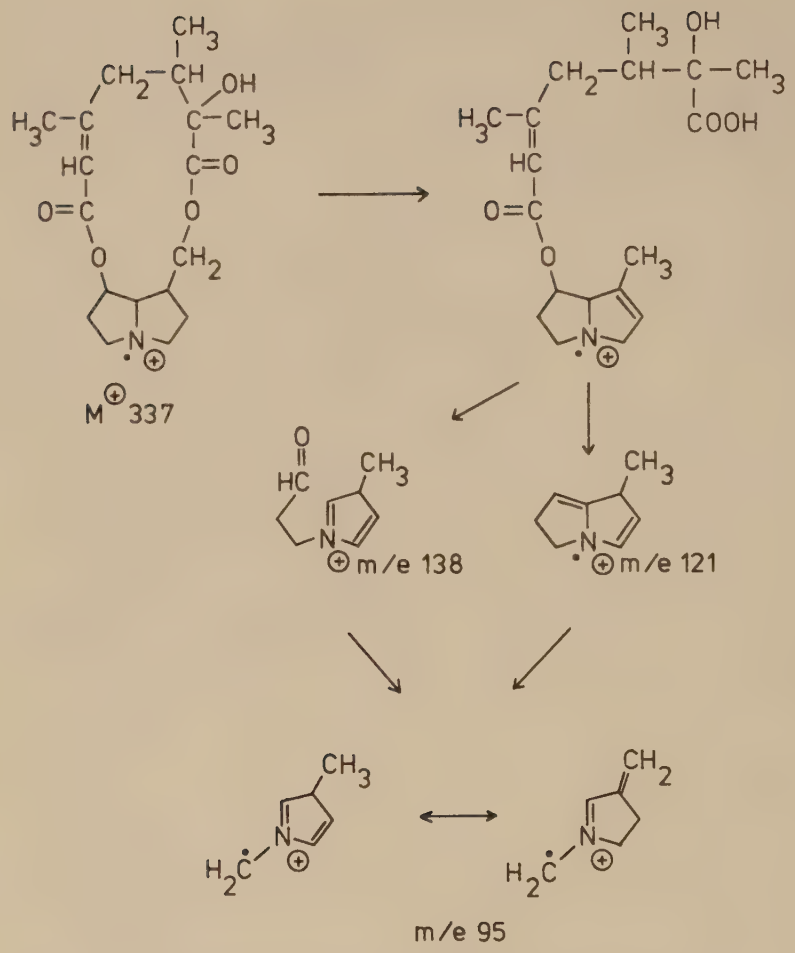


Abb.13b. Zerfallsreihe II von Alkaloid B

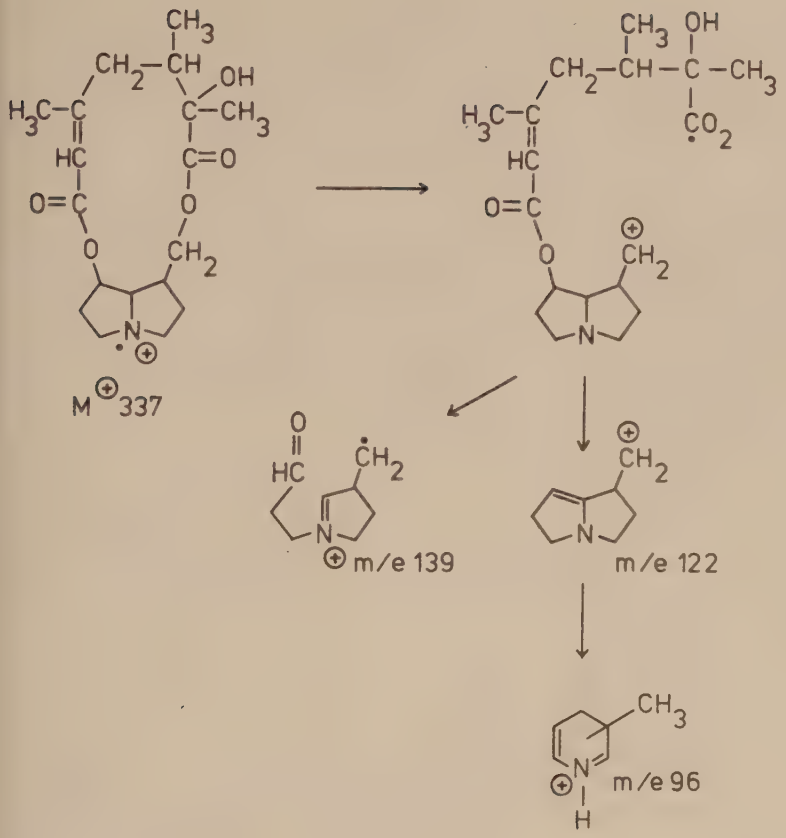


Abb.13c. Zerfallsreihe III von Alkaloid B

Ein zusätzlicher, bemerkenswerter Zerfall weist als erstes Fragment m/e 211 mit der Summenformel $C_{11}H_{17}NO_3$ auf. Weitere Peaks sind bei m/e 140 und 122 zuzuordnen. Es wird bei dieser Fragmentierung die Bindung des stabileren α,β-ungesättigten Esters zuerst gespalten. Abb.14 gibt das Fragmentierungsschema wieder.

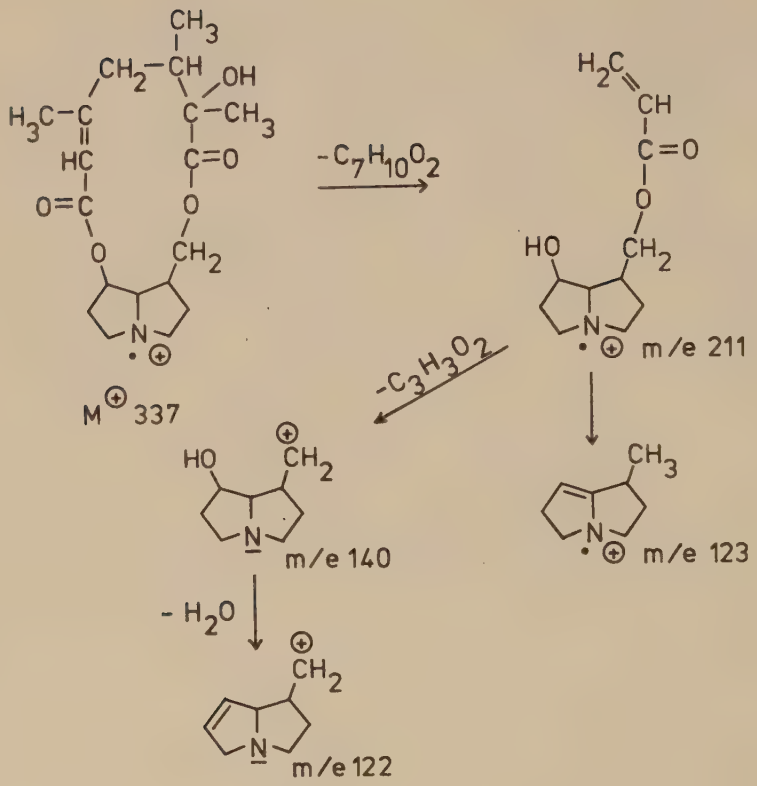


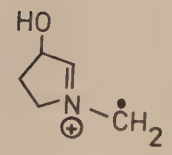
Abb.14. Zerfallsreihe IV von Alkaloid B

Wie schon beim Doronenin zu beobachten war, tritt auch hier keine Spaltung der Bindung C_7-C_8 des Necins auf. Als Beweis kann das Fehlen des Fragments m/e 99 angeführt werden [44].

---

44) *H.Budzikiewicz*, Fortschritte der Massenspektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim, 3, 229 (1975)

m/e 99



Das ^{1}H-NMR-Spektrum von Alkaloid B ist in Abb.15 wiedergegeben; die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

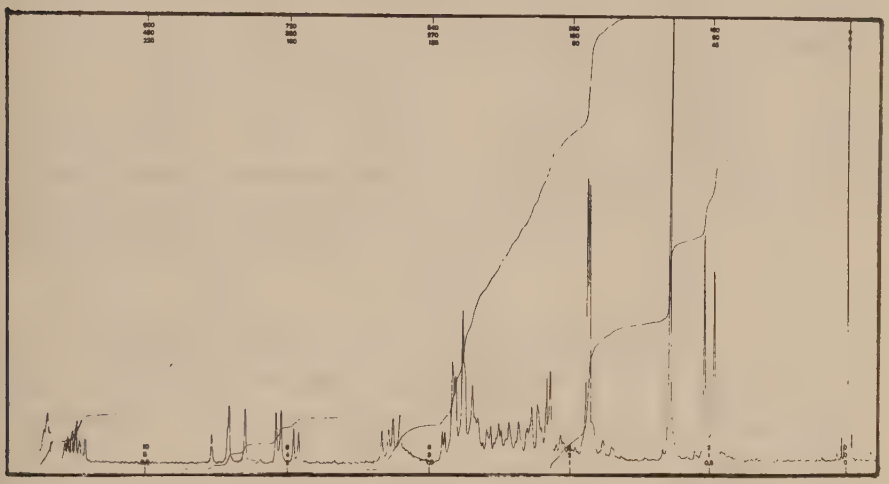


Abb.15. ^{1}H-NMR-Spektrum von Alkaloid B

Wie schon aus dem Massenspektrum abgeleitet werden kann, liegt diesem Alkaloid ein gesättigtes Necin zugrunde. Die down- und upfield-Signale der Methylenprotonen am C_2 und C_6 überlagern sich ebenso wie die am C_3 und C_5, wobei die letzteren aufgrund des benachbarten Stickstoffs ins tiefere Feld verschoben sind.

Das C_1-Methinproton erscheint als Multiplett bei 3.30 ppm, während das Proton am C_8 als doppeltes Dublett bei 3.30 ppm mit den Kopplungskonstanten J= 6.5 Hz und J= 4.5 Hz gekennzeichnet ist.

Diese Interpretation wird durch Entkoppeln des C_8-Methinprotons, das eine starke Vereinfachung des Multipletts des C_1- und C_7-Protons hervorruft, bewiesen. Wird hingegen auf das C_7-Proton eingestrahlt, so wird das C_8-Proton zu einem einfachen Dublett aufgespalten, während die Peaks der C_6-Methylenprotonen und die durch Fernkopplung beeinflußten Protonen am C_{15} und C_{19}, ähnlich wie beim Doronenin, stark vereinfacht zu erkennen sind. Das Entkoppeln des C_{15}-Methinprotons zeigt denselben Effekt, der schon beim Doronenin zu sehen war.
Durch das Methinproton am C_1 sind die Methylenprotonen am C_9 lediglich als Doppeldublett bei 4.42 und 4.01 ppm mit den Kopplungskonstanten J= 11.5 Hz und J= 3.0 Hz aufgespalten. Beim Einstrahlen auf das downfield- bzw. upfield-Signal entsteht das entsprechende Dublett, während der Peak für das C_1-Proton vereinfacht wird.

Wie aus den bisherigen spektroskopischen Daten zu ersehen ist, tritt in beiden Alkaloiden die gleiche Säurekomponente auf, der die Struktur einer 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure zukommt.
Die Aufnahme eines ^{13}C-NMR-Spektrums, das die Abb.16 zeigt und dessen Daten in Tab.7 wiedergegeben sind, bestätigt diese Interpretation. In der off-resonance-Entkopplung sind 3 primäre, 6 sekundäre, 5 tertiäre und 3 quartäre C-Atome zu erkennen.
Hieraus und aus den mit Doronenin übereinstimmenden Werten für den Säureteil ist zu folgern, daß ein gesättigtes Pyrrolizidin vorliegt. Die Verschiebung der Signale für das C_1- und das C_2-Atom ins hohe Feld nach 37.6 bzw. 32.7 ppm bestätigt dies. Die ppm-Werte der übrigen C-Atome decken sich mit denen des Doronenins.

Der Unterschied der beiden Alkaloide liegt demnach lediglich im Auftreten einer Doppelbindung im Necin.

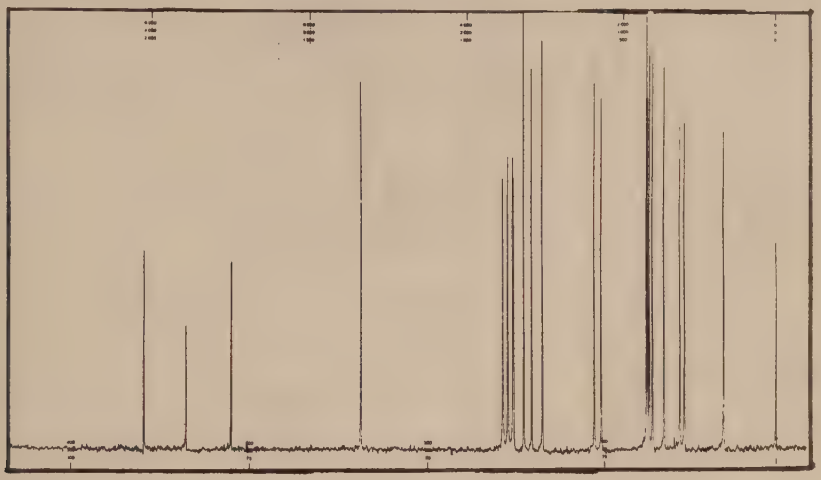
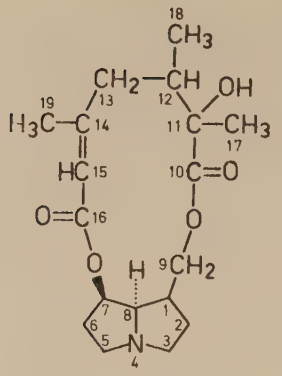


Abb.16. ^{13}C-NMR-Spektrum von Alkaloid B

Die spektroskopischen und physikalischen Daten dieses Alkaloids weisen auf ein in der Literatur bereits beschriebenes hin. Es handelt sich hierbei um Bulgarsenin, das von *Nguyen Thi Nghia*, *Sedmera*, *Klasek*, *Boeva*, *Dranovska*, *Dolejs* und *Santavy* aus verschiedenen Unterarten der Senecio nemorensis L. zum ersten Mal isoliert wurde [48].

48) *Nguyen Thi Nghia*, *P.Sedmera*, *A.Klasek*, *A.Boeva*, *L.Dranovska*, *L.Dolejs* und *F.Santavy*, Collect.Czech.Chem.Commun. 41, 2952 (1976)



Bulgarsenin

Tab.6. ^{1}H-NMR-Daten von Alkaloid B

C-Atom	ppm [δ]	J [Hz]	ppm [δ]	J [Hz] *)
1	3.30 (m)			
2	2.74 (m) 2.27 (m)			
3	2.88 (m) 2.55 (m)			
5	2.88 (m) 2.55 (m)			
6	2.74 (m) 2.27 (m)			
7	5.50 (m)		5.49 (m)	
8	3.30 (dd)	6.5; 4.5	3.31 (dd)	4.4; 6.8
9	4.42 (m) 4.01 (dd)	 11.5; 3.0	4.40 (t) 4.00 (dd)	10.8 10.8; 2.9
10	-			
11	3.19 (s)	(OH-Gruppe)		
12	2.41 (m)		-	
13	2.74 (m) 2.14 (m)		-	
14	-			
15	5.66 (m)		5.65 (m)	
16	-			
17	1.26 (s)		1.27 (s)	
18	1.00 (d)	6.5	1.00 (d)	6.2
19	1.87 (d)	1,5	1.87 (d)	1,3

*) Die gefundenen Werte sind den Literaturdaten [48] gegenübergestellt.

Tab.7. ^{13}C-NMR-Daten von Alkaloid B

C-Atom	ppm [δ]	Bindungsmultiplizität	C-Atom	ppm [δ]	Bindungsmultiplizität
1	37.6	C-$\underline{C}$H<	11	75.7	C-$\underline{C}$<
2	32.7	C-$\underline{C}$H$_2$-	12	36.0	C-$\underline{C}$H<
3	50.6	C-$\underline{C}$H$_2$-N	13	37.3	C-$\underline{C}$H$_2$-
5	52.6	C-$\underline{C}$H$_2$-N	14	154.4	C=$\underline{C}$<
6	37.0	C-$\underline{C}$H$_2$-	15	118.3	C=$\underline{C}$H-
7	72.6	C-$\underline{C}$H<O	16	166.9	C-$\underline{C}$OOR
8	70.4	C-$\underline{C}$H<N	17	26.8	C-$\underline{C}$H$_3$
9	67.4	C-$\underline{C}$H$_2$-O	18	15.5	C-$\underline{C}$H$_3$
10	187.7	C-$\underline{C}$OOR	19	28.1	C-$\underline{C}$H$_3$

6.3. Necine

Das in Abb.17 wiedergegebene Massenspektrum des stark verunreinigten Necins von Doronenin zeigt einen Molpeak von $M^{\oplus}$ 155, dem die Summenformel $C_8H_{13}NO_2$ zugeordnet werden kann. Das in Abb.18 skizzierte Fragmentierungsschema ist für Retronenin charakteristisch [49].

49) *N.Neuner-Jehle, H.Nesvadba* und *G.Stiteller*, Monatsh.Chem. 96, 321 (1965)

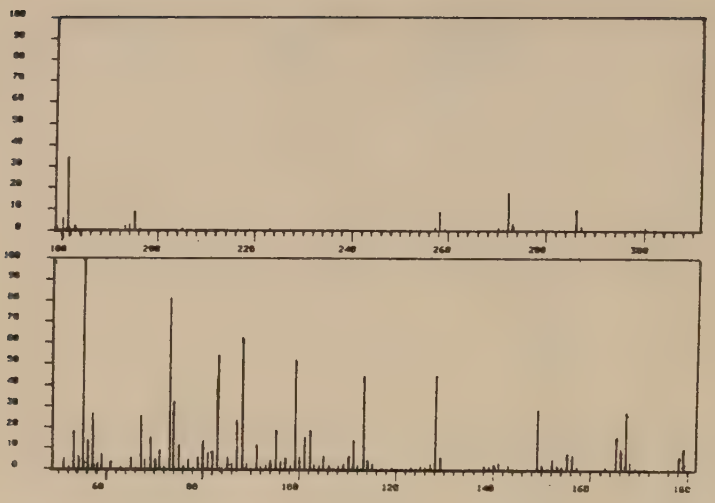


Abb.17. Massenspektrum des Necins von Doronenin

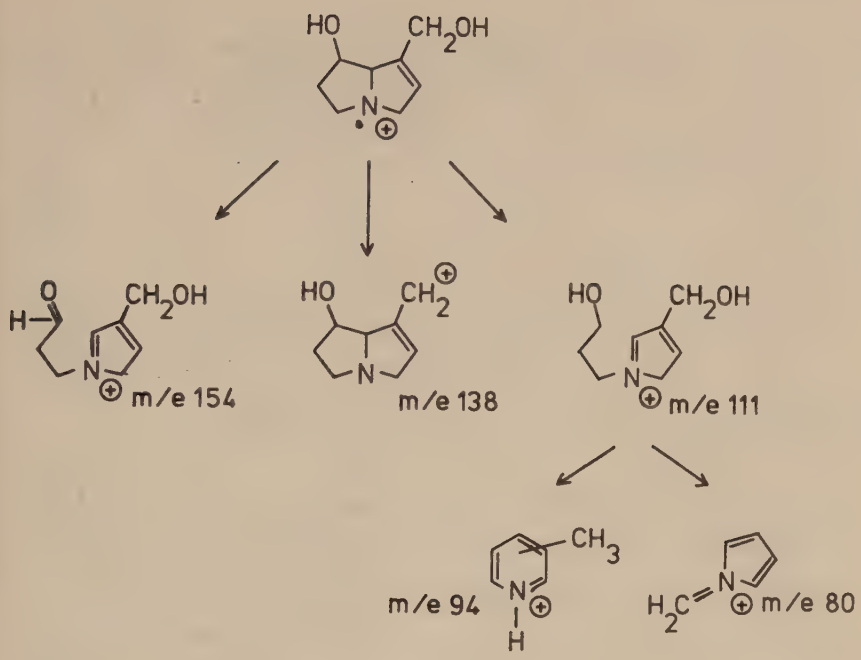


Abb.18. Fragmentierungsschema von Retronecin

Das Massenspektrum des isolierten Necins von Bulgarsenin ließ sich nicht interpretieren.

6.4. Necinsäure

6.4.1. Ringförmige Struktur: Nemorensinsäure

Die Abb.19 zeigt das IR-Spektrum der isolierten Säure. Es ist nur eine Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} zu erkennen. Die Banden für eine Doppelbindung bei 1650 cm^{-1} und für eine OH-Gruppe bei 3300 cm^{-1} fehlen.

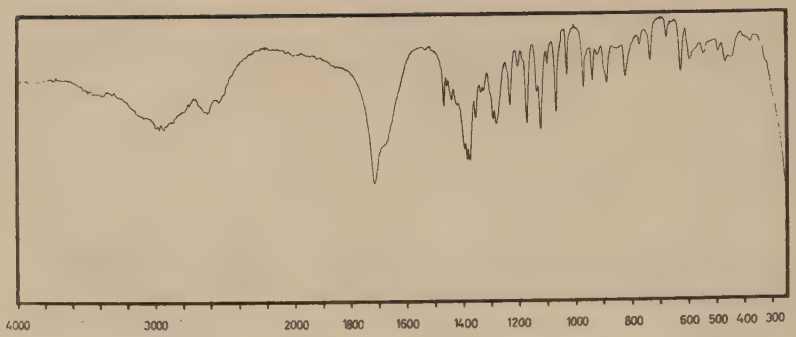


Abb.19. IR-Spektrum der isolierten Necinsäure

Das Massenspektrum, das in Abb.20 wiedergegeben ist, weist einen Molekülpeak von $M^{\oplus}$ 227 (0.5%) auf, für den die Summenformel $C_{10}H_{17}O_5$ aufgestellt werden kann. Weitere charakteristische Peaks treten auf bei m/e 199 (0.8), 171 (100.0), 153 (66.1) und 125 (83.4). Hierfür wird das in Abb.21 gezeigte Fragmentierungsschema vorgeschlagen.

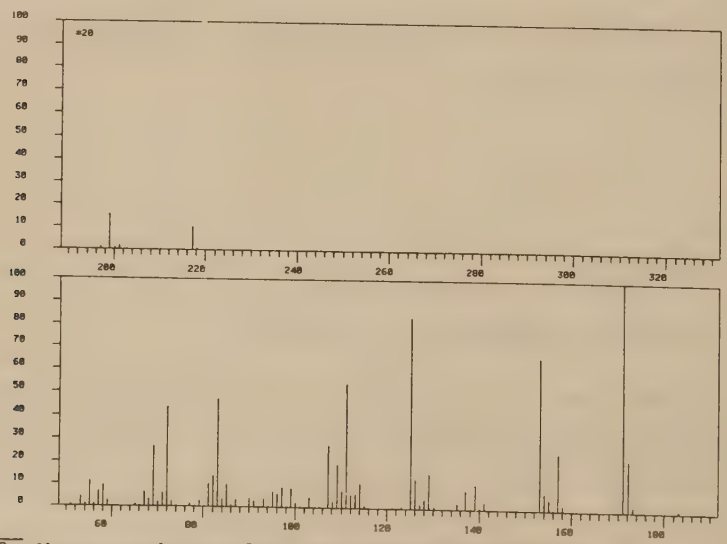


Abb.20. Massenspektrum der isolierten Necinsäure

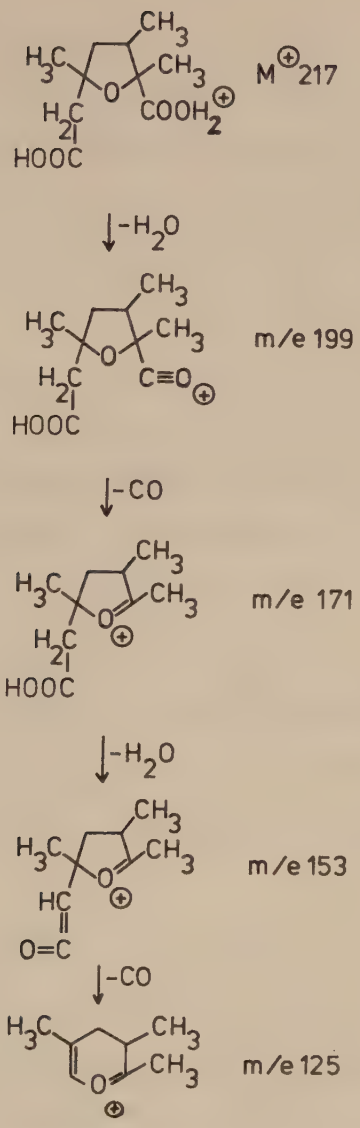


Abb.21. Zerfallsreihe der Necinsäure

Durch Hochauflösung können den weiteren Fragmenten die folgenden Summenformeln zugeordnet werden: m/e 111 [(54.2) $C_7H_{11}O$]; 83

[(47.1) C_6H_{11}]; 72 [(43.5) C_4H_8O]; 69 [(26.3) C_5H_9].
Bei dem Molekülpeak handelt es sich um die protonierte Säure. Diese Interpretation wird durch das Fragment m/e 199 bewiesen, das durch Wasserabspaltung entstanden sein muß. Daß es sich hierbei nicht um eine Anhydridbildung handelt, geht aus der zweiten H_2O-Elimination hervor, die nur, wie im Fragmentierungsschema aufgezeigt, zu erklären ist.

Abb.22 zeigt das ^{1}H-NMR-Spektrum der isolierten Necinsäure; die dazugehörigen Daten sind in Tab.8 aufgeführt.
Die Ergebnisse aus den IR- und dem Massenspektrum werden bestätigt. Es liegt keine allylische Struktur, erkennbar an der Kopplungskonstante und an dem nach tieferen Feld verschobenen Signal des Methinprotons, vor. Die C_{19}-Methylgruppe erscheint ebenso als Singulett wie die C_{17}-Methylprotonen, bedingt durch ihre Stellung an einem quartären C-Atom. Die C_{18}-Methylgruppe tritt als Dublett mit der Kopplungskonstante J= 7.0 Hz auf, die für einen benachbarten tertiären Kohlenstoff charakteristisch ist. Mit D_2O wird kein austauschbares Hydroxylproton nachgewiesen.

Durch die Verseifung der Alkaloide ist eine Umlagerung der Säure von der offenkettigen in die cyclische Form eingetreten. Wie schon beim Doronenin diskutiert, ist aus den Spektren nicht mit eindeutiger Sicherheit zu schließen, ob ein Furan- (a) oder ein Pyranring (b), je nach Stellung des Methinprotons am C_{15} bzw. am C_{14}, gebildet wird. Abb.23 gibt diesen Sachverhalt wieder.

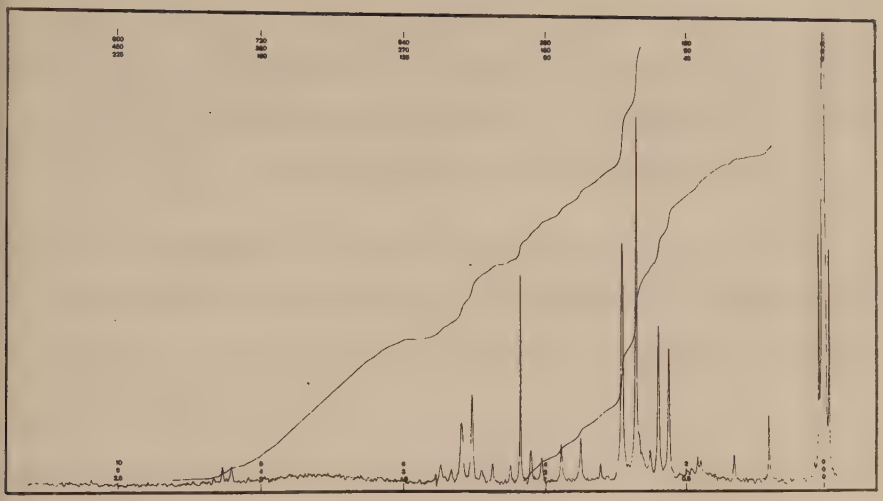


Abb.22. ^{1}H-NMR-Spektrum der Necinsäure

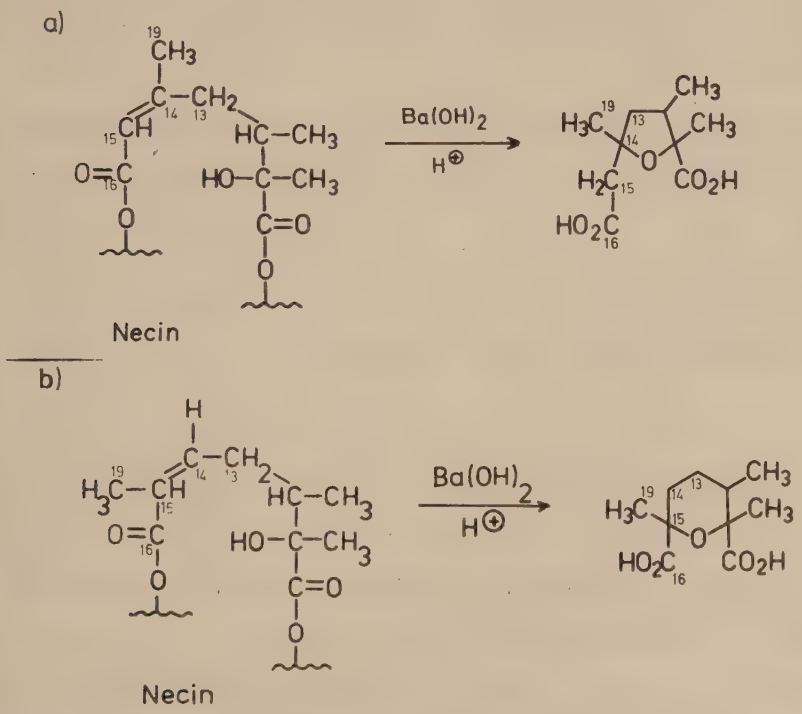


Abb.23. Cyclisierungsmöglichkeiten der Säure nach der Verseifung

Die beiden möglichen Ringsysteme weisen die Struktur eines 2-Carboxymethyl-5-carboxy-2,4,5-trimethyl-2,3,4,5-tetrahydrofurans (a) bzw. eines 2,6-Dicarboxy-2,3,6-trimethyl-2,3,5,6-tetrahydropyrans (b) auf.

Für die Bildung eines Furanringes spricht die zweimalige H_2O- und CO-Abspaltung im Massenspektrum, die vermutlich nur mit der in Abbildung 21 gezeigten Fragmentierung zu erklären ist. Die chemische Verschiebung der C_{15}-Methylenprotonen bei 2.55 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum deutet ebenfalls auf den Furanring hin. Beim Vorliegen eines Pyranringes wäre die Verschiebung ins tiefere Feld unwahrscheinlich.

Zur vollständigen Klärung wird ein ^{13}C-NMR-Spektrum angefertigt, das in Abb.24 wiedergegeben ist und dessen Werte aus Tabelle 10 ersichtlich sind.

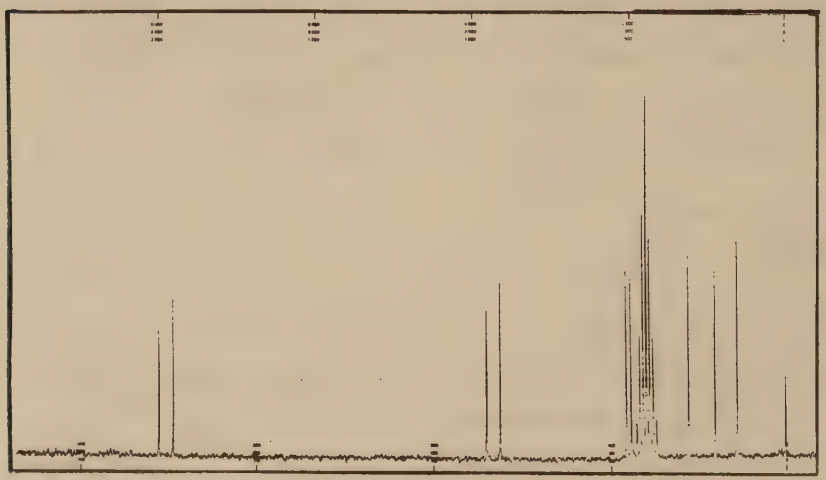


Abb.24. ^{13}C-NMR-Spektrum der Necinsäure

Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt in der off-resonance entkoppelten Aufnahme 3 primäre, 2 sekundäre, 1 tertiäres und 4 quartäre C-Atome.

Die eingetretene Cyclisierung ist am C_{14}- und C_{15}-Atom zu erkennen: das quartäre C_{14}-Atom ist stark ins höhere Feld nach 84.4 ppm verschoben; das tertiäre C_{15}-Atom bei 118 ppm erscheint nicht mehr, dafür tritt eine weitere Methylgruppe bei 45.2 ppm auf.

Letztlich beweist das ^{13}C-NMR-Spektrum die Bildung des Furanringes. Läge ein Pyranring vor, so dürften die ppm-Werte der beiden Carboxyl-Kohlenstoffe C_{10} und C_{16} nicht so stark - um 4.1 ppm - voneinander differieren.

Die Cyclisierung der Säure verläuft nach der Markownikow-Regel. Im anderen Fall wäre 2,6-Dicarboxy-2,3,5-trimethyl-2,3,5,6-tetrahydropyran gebildet worden. Diese Verbindung hätte im off-resonance entkoppelten Spektrum 3 primäre, 1 sekundäres, 3 tertiäre und 4 quartäre C-Atome zeigen müssen. Dies ist aber aus dem vorliegenden Spektrum nicht zu interpretieren.

Hiernach weist die isolierte Säure die Struktur eines 2-Carboxymethyl-5-carboxy-2,4,5-trimethyl-2,3,4,5-tetrahydrofurans [Struktur (a) der Abbildung 23] auf.

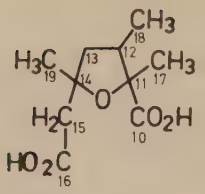
Die physikalischen und spektroskopischen Daten der Säure stimmen mit einer Substanz überein, die aus verschiedenen Varietäten der Senecio nemorensis L. isoliert und dort Nemorensinsäure genannt wurde [48].

Die absolute Konfiguration der Nemorensinsäure wird durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt [47]. Es liegt danach die Struktur eines (2S,4R,5R)-2-Carboxymethyl-5-carboxy-2,4,5-trimethyl-2,3,4,5-tetrahydrofurans vor.

---

47) *A.Kirfel, H.Wiedenfeld, G.Will* und *E.Röder*, unveröffentlichte Ergebnisse

48) *Nguyen Thi Nghia, P.Sedmera, A.Klasek, A.Boeva, L.Dranovska, L.Dolejs* und *F.Santavy*, Collect.Czech.Chem.Commun. 41, 2952 (1976)



Nemorensinsäure

Tab.8. ^{1}H-NMR-Daten der Necinsäure

C-Atom	δ [ppm]	C-Atom	δ [ppm]	J [Hz]
10	-	15	2.55 (s)	
11	-	16	-	
12	1.79 (m)	17	1.35 (s)	
13	2.00 (m)	18	1.16 (d)	7.0
14	-	19	1.47 (s)	

Tab.9. ^{13}C-NMR-Daten der Necinsäure

C-Atom	δ [ppm]	Bindungsmultiplizität	C-Atom	δ [ppm]	Bindungsmultiplizität
10	172.2	C-COOH	15	45.2	C-CH_2-
11	80.6	C-C-O	16	176.3	C-COOH
12	39.4	C-CH<	17	20.1	C-CH_3
13	43.8	C-CH_2-	18	13.8	C-CH_3
14	84.4	C-C<O	19	27.5	C-CH_3

6.4.2. Offenkettige Struktur

Bei der Verseifung der Alkaloide mit Bariumhydroxid konnte, wie oben beschrieben, ausschließlich die cyclische Form nachgewiesen werden. Die von *Klasek et al.* [48] durchgeführte Hydrolyse des Bulgarsenins führte zu dem gleichen Ergebnis. Es soll daher eine Vorschrift erarbeitet werden, bei der keine Cyclisierung erfolgt.

Die offenkettige Form der Nemorensinsäure ist erstmalig von *Klasek et al.*[50] durch Ausschütteln eines Methanolextraktes von Senecio nemorensis L. mit gesättigter Bicarbonatlösung isoliert worden. Es konnte hierbei nicht aufgeklärt werden, ob es sich, biochemisch gesehen, um eine Vorstufe oder um ein Abbauprodukt eines Alkaloids handelt.
Da die offenkettige Form, die 5-Hydroxy-2,5-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure, beim Behandeln mit gesättigter Bicarbonatlösung erhalten bleibt, sollen die Alkaloide auf diesem Wege verseift werden. Trotz sehr langer Reaktionszeit gelingt es nicht, die Pyrrolizidinalkaloide bei Raumtemperatur zu hydrolysieren. Erst bei Erhöhung der Temperatur auf 50°C findet eine Verseifung statt, wobei aber augenblicklich die Cyclisierung eintritt.
Nach einer einstündigen sauren Verseifung mit 10%iger Salzsäure wird ebenfalls die Nemorensinsäure isoliert.

---

48) *Nguyen Thi Nghia, P.Sedmera, A.Klasek, A.Boeva, L.Dranovska, L.Dolejs* und *F.Santavy*, Collect.Czech.Chem.Commun. 41, 2952 (1976)

50) *A.Klasek, P.Sedmera, A.Boeva* und *F.Santavy*, Collect.Czech. Chem.Commun. 38, 2504 (1973)

7. PARTIALSYNTHESE DER NECINSÄUREN

Da die offenkettige Form der Necinsäure der beiden Alkaloide Doronenin und Bulgarsenin bislang, wie in 6.4.2. erwähnt, nur aus einem Frischpflanzenextrakt von Senecio nemorensis L. isoliert werden konnte, wird ein Weg zur Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure erarbeitet. Die Synthese soll so geführt werden, daß eine Cyclisierung zur Nemorensinsäure nicht eintritt.

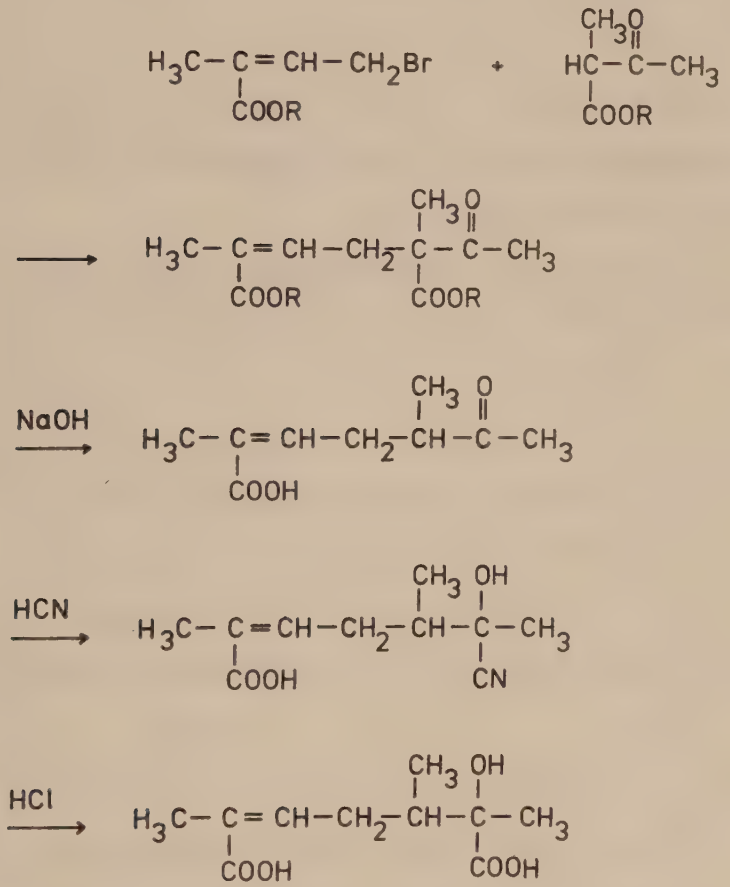
Darüber hinaus wird erstmalig die zur offenkettigen Form der Nemorensinsäure strukturisomere C_{10}-Dicarbonsäure, die 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure, synthetisiert. Wie in Abb. 23 gezeigt, unterscheiden sich die beiden isomeren Säuren lediglich in der Stellung der Methylgruppe an der Doppelbindung. Bei dieser Synthese soll ebenfalls die Cyclisierung zum 2,6-Dicarboxy-2,3,6-trimethyl-2,3,5,6-tetrahydropyran (Abb.23b) verhindert werden.

Durch die beiden Synthesen soll eine exakte und eindeutige Zuordnung der Protonen im ^{1}H-NMR-Spektrum der Alkaloide bestätigt werden. Ferner sollen die chemischen Eigenschaften der beiden Necinsäuren durch eine Synthese weitgehend aufgeklärt werden.

Die beiden offenkettigen Säureformen stellen C_{10}-Dicarbonsäuren dar, die sich formal aus zwei C_5-Körpern ableiten. Den einen Grundstein bildet in beiden Fällen die 2-Methyl-2-hydroxypentansäure, während der andere die Tiglinsäure bzw. bei der Synthese der offenkettigen Nemorensinsäure die 3,3-Dimethylacrylsäure enthält. Die beiden zuletzt genannten, strukturisomeren Substanzen dienen bei den Synthesen als Ausgangsverbindungen.

7.1. Versuch der Synthese der 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-Dicarbonsäure

Die geplante Synthese ist im folgenden Reaktionsschema wiedergegeben:



γ-Bromtiglinsäuremethylester wird mit α-Methylacetessigsäureethylester in einer Alkylierungsreaktion zu 5-Methyl-6-oxo-2-hepten-2-methyl-5-ethyldiester kondensiert [51]. Die weiteren Re-

51) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1973, S.539

aktionsschritte, Verseifung mit anschließender Decarboxylierung, Cyanhydrinreaktion und Verseifung des Nitrils, sollen zur gewünschten 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure führen. Die Hauptschwierigkeiten liegen in der Synthese des γ-Bromtiglinsäuremethylesters, dessen Darstellung auf verschiedenen Wegen versucht wird.

7.1.1. Versuch der Synthese des γ-Bromtiglinsäuremethylesters (7) durch *Wohl-Ziegler*-Bromierung [52,53]

Die als Ausgangssubstanz dienende Tiglinsäure wird zuerst verestert und anschließend in Allylstellung mit NBS bromiert [53]. Es wird ein Gemisch der β- und γ-Form des Bromtiglinsäuremethylesters (2) erhalten. Nach *Löffler* [54] können diese Isomeren nur durch fraktionierte Destillation ihrer Hydroxy-substituierten Methylester 5 getrennt werden. Diese werden durch zweimalige Hydrolyse mit HBr und NaOH und anschließender Veresterung erhalten. Als Zwischenprodukt fallen die bromierten (3) bzw. hydroxylierten Säuren (4) an. Die getrennten Hydroxytiglinsäuremethylester werden durch Reaktion mit PBr_3 in ihre Bromderivate 6 und 7 überführt.

Trotz zufriedenstellender Ausbeuten gelang es nicht, die isomeren Hydroxyester durch eine fraktionierte Vakuumdestillation zu trennen. Eine wie auch von *Löffler* benutzte Drehband-Kolonne

---

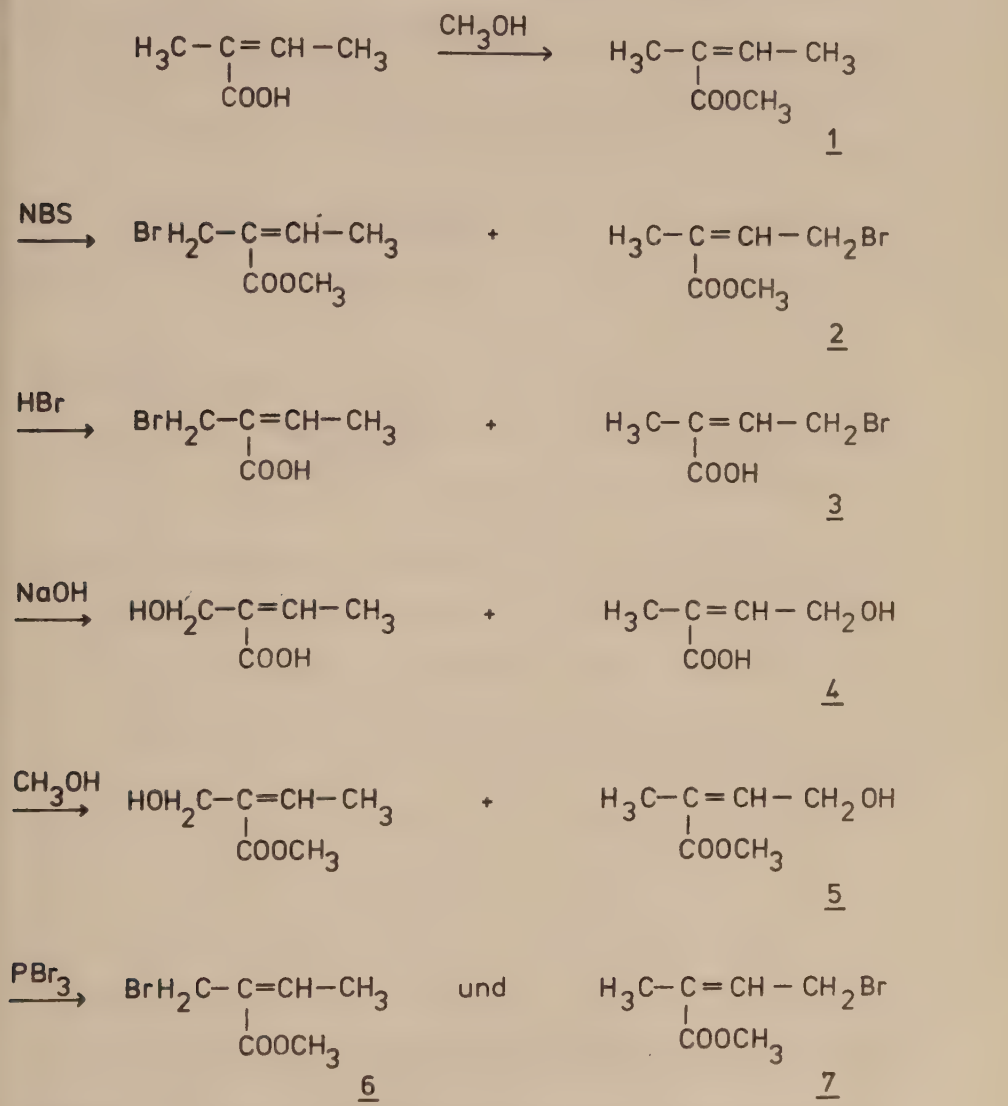
52) *K.Ziegler*, *A.Späth*, *E.Schaaf*, *W.Schumann* und *E.Winkelmann*, Justus Liebigs Ann.Chem. 551, 80 (1942)

53) *L.Horner* und *E.Winkelmann*, Angew.Chem. 71, 349 (1959)

54) *A.Löffler*, *R.J.Pratt*, *H.P.Ruesch* und *A.S.Dreiding*, Helv.Chim. Acta 53, 383 (1970)

stand nicht zur Verfügung.

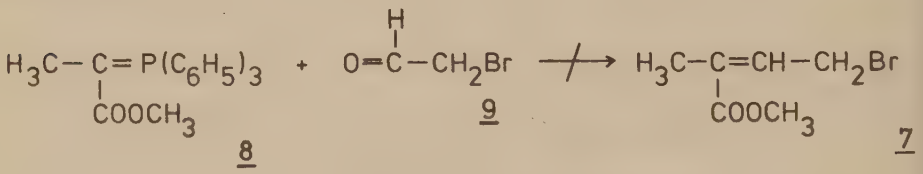
Das Schema 1 gibt die einzelnen Reaktionsstufen wieder.



Schema 1. γ-Bromtiglinsäuremethylester-Synthese durch *Wohl-Ziegler*-Bromierung

7.1.2. Versuch der Synthese des γ-Bromtiglinsäuremethylesters (7) durch *Wittig*- Reaktion

Analog zur Synthese von Tiglinsäuremethylester aus (α-Carbomethoxy-ethyl)triphenylphosphoran (8) und Acetaldehyd bietet sich eine *Wittig*-Reaktion aus Bromacetaldehyd und dem Ylid 8 an [55].



8 9 7

Zu dem Phosphoran 8 wird frisch destillierter Bromacetaldehyd (9) [56], dargestellt durch Bromierung von Essigsäurevinylester mit anschließender Hydrolyse, zugetropft. Das gewünschte Produkt 7 wird nicht erhalten.

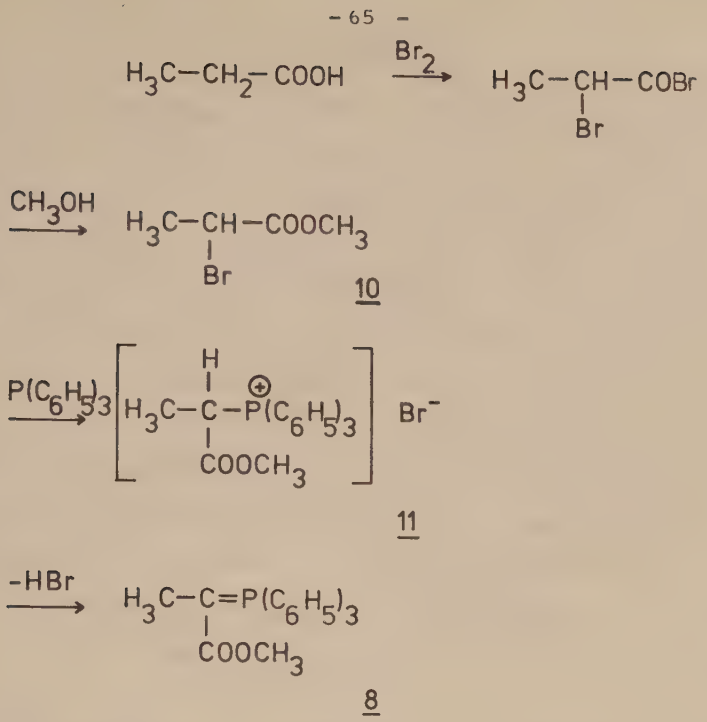
Die Herstellung des Phosphorans 8 [57] ist im Reaktionsschema 2 aufgezeigt. Die bromierte und anschließend veresterte Propionsäure 10 wird mit Triphenylphosphin zu dem Phosphoniumbromid 11 umgesetzt. Durch Behandeln mit Natronlauge wird 11 in das entsprechende Phosphoran 8 überführt.

---

55) *H.O.House* und *G.H.Rasmusson*, J.Org.Chem. 26, 4278 (1961)

56) *A.Kirrmann*, *P.Chancel*, *M.Vignalon* und *P.Federlin*, Bull.Soc. Chim. 1950, 707

57) *O.Isler*, *H.Gutmann*, *M.Montavon*, *R.Rüegg*, *G.Ryser* und *P.Zeller*, Helv.Chim.Acta 40, 1242 (1957)



Schema 2. Synthese des (α-Carbomethoxy-ethyl)triphenylphosphorans 8

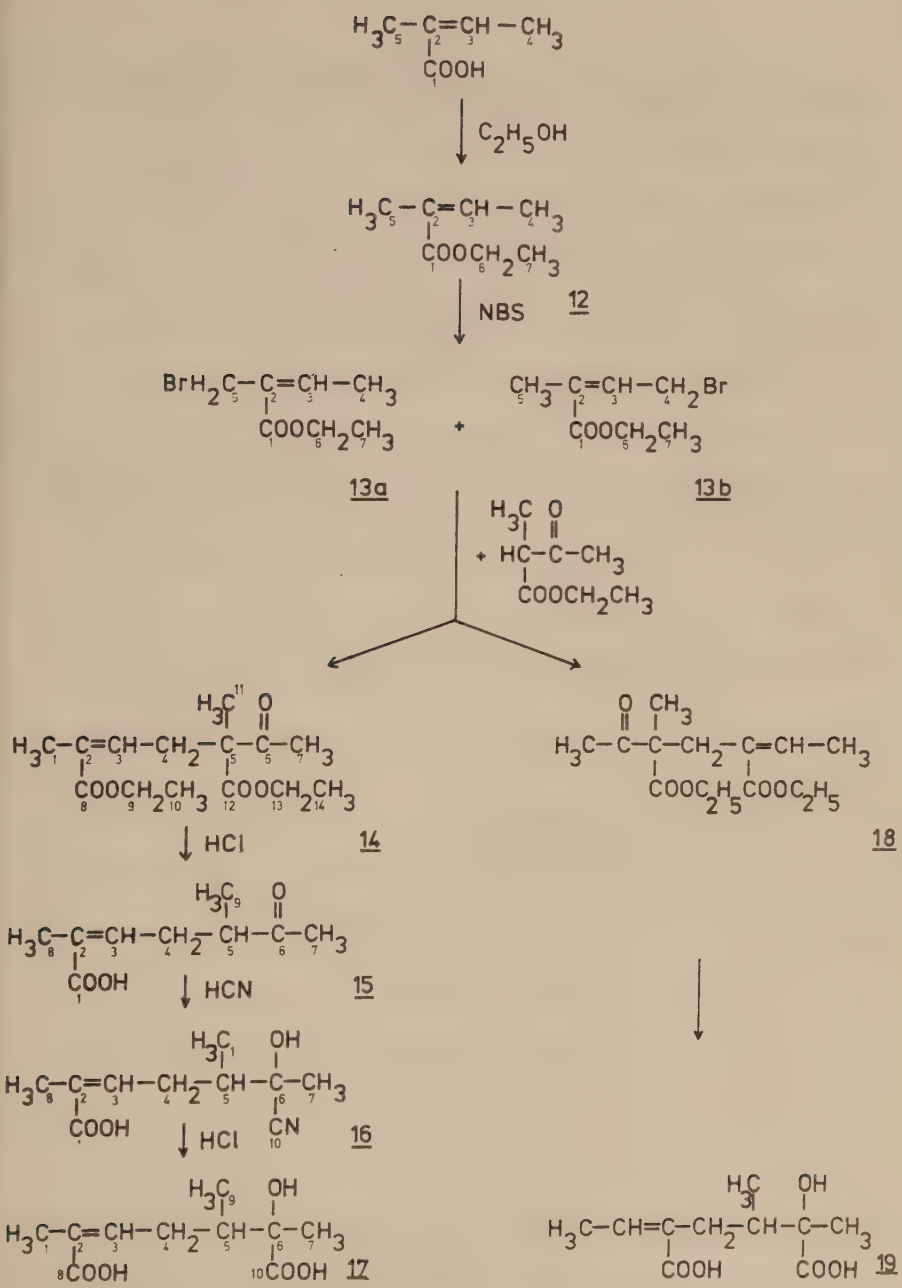
7.2. Synthese der 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure (17)

Es gelang nicht, wie in Kap. 7.1. beschrieben, den γ-Bromtiglinsäuremethylester selektiv zu erhalten. Es wird daher das analog zu 7.1.1. hergestellte Gemisch des in β- und γ-Stellung bromierten Tiglinsäureethylesters 13a,b mit α-Methylacetessigsäureethylester nach Reaktionsschema 3 umgesetzt. Das in γ-Stellung kondensierte Produkt, der 5-Methyl-6-oxo-2-hepten-2,5-dicarbonsäurediethylester 14, kann nach einer Vakuumdestillation isoliert werden.

Nach dem Prinzip der Ketonspaltung eines substituierten Acetessig-

säureesters wird der Diester mit Salzsäure quantitativ verseift und in β-Stellung zum Keton decarboxyliert. Es wird die 2,5-Dimethyl-6-oxo-2-heptensäure 15 erhalten. Nach einer Cyanhydrinreaktion wird 15 im Sauren mit HCN zum Nitril 16 umgesetzt. Trotz Zugabe von Phosphorsäure als Stabilisierungsmittel zersetzt sich das Cyanhydrin beim Destillieren. Es ist daher angezeigt, das rohe Nitril direkt mit HCl zur 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure (17) zu verseifen.

Es ist anzunehmen, daß die β-Form des Bromtiglinsäureethylesters zu dem entsprechenden Reaktionsprodukt 18, dem 5-Methyl-6-oxo-2-hepten-3,5-dicarbonsäurediethylester, umgesetzt wird. Trotz sorgfältiger Reinigung durch eine Vakuumdestillation kann 18, die Vorstufe der Senecinsäure, nicht erhalten werden.



Schema 3. Synthese der 6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-2,5-dicarbonsäure (17)

7.3. Versuch der Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure

Um zur Titelverbindung zu gelangen, wird die 3,3-Dimethylacrylsäure zunächst verestert und dann mit NBS bromiert [53]. Es wird ein Gemisch der cis- und trans-Form des 4-Brom-3-methyl-2-butensäureethylesters (20) erhalten. Das Isomerengemisch von 20 wird nach dem Prinzip einer Alkylierungsreaktion in einer Alkoholat-Lösung mit α-Methylacetessigsäureethylester umgesetzt. Bei dieser stark exothermen Reaktion spaltet sich unmittelbar nach der Kondensation der beiden Ester die Acetylgruppe ab, wodurch der 2-Methyl-1-penten-1,4-dicarbonsäurediethylester (21) erhalten wird. Diese Reaktion ist ungewöhnlich, da beim Arbeiten in Alkoholat-Lösung keine Säurespaltung stattfinden sollte. Hierzu wird normalerweise mindestens 50%ige Alkalilauge benötigt. Ferner ist mit einer Säurespaltung immer eine gleichzeitige Verseifung des Esters verbunden.

Durch Verseifung des Diesters 21 wird die entsprechende C_8-Dicarbonsäure, die 2-Methyl-1-penten-2,4-dicarbonsäure (22), erhalten. Abbildung 25 gibt den Reaktionsverlauf wieder.

---

53) *L.Horner* und *E.Winkelmann*, Angew.Chem. 71, 349 (1959)

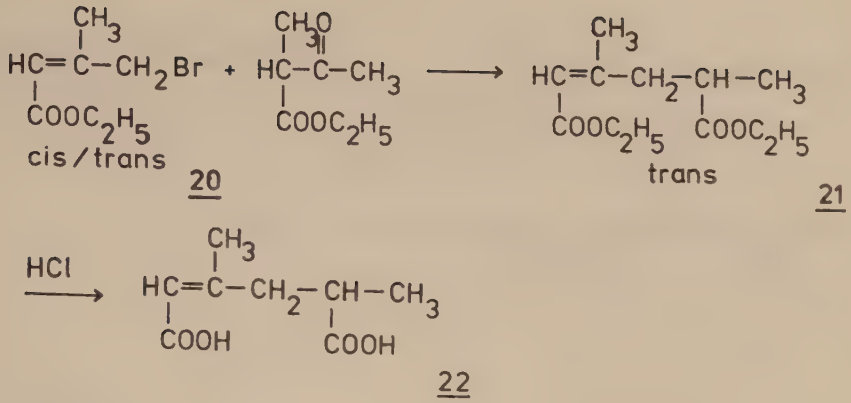


Abb.25. Synthese der 2-Methyl-1-penten-2,4-dicarbonsäure (22)

7.4. Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure (28)

Analog zu 7.3. wird die cis- und trans-Form des 4-Brom-3-methyl-2-butensäureethylesters (24) durch Veresterung und anschließender Bromierung der 3,3-Dimethylacrylsäure erhalten. Die destillierte Substanz 24 wird mit der β-Dicarbonylverbindung α-Methylacetessigsäureethylester unter der katalytischen Wirkung von Dibenzo[18]-krone-6 [58] umgesetzt. Als Verknüpfungsprodukt wird 2,4-Dimethyl-5-oxo-1-hexen-1,4-dicarbonsäurediethylester (25) erhalten. 25 wird mit Natronlauge verseift und in β-Stellung zum Keton decarboxyliert. Durch Ausfrieren wird die 3,5-Dimethyl-6-oxo-2-heptensäure (26) erhalten. Diese wird im Sauren mit HCN zum Cyanhydrin 27 umgesetzt [59], das wegen seiner Instabilität mit Salzsäure di-

58) *F.Vögtle* und *E.Weber*, Kontakte (Merck) 1/77, 11

59) *C.C.J.Culvenor* und *T.A.Geissmann*, J.Am.Chem.Soc. 83, 1647 (1961)

rekt verseift wird [59]. Aus einem Aceton/Petrolether-Gemisch kann die offenkettige Form der Nemorensinsäure, die 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure (28) ölig erhalten werden.

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 26 dargestellt.

59) *C.C.J.Culvenor* und *T.A.Geissmann*, J.Am.Chem.Soc. 83, 1647 (1961)

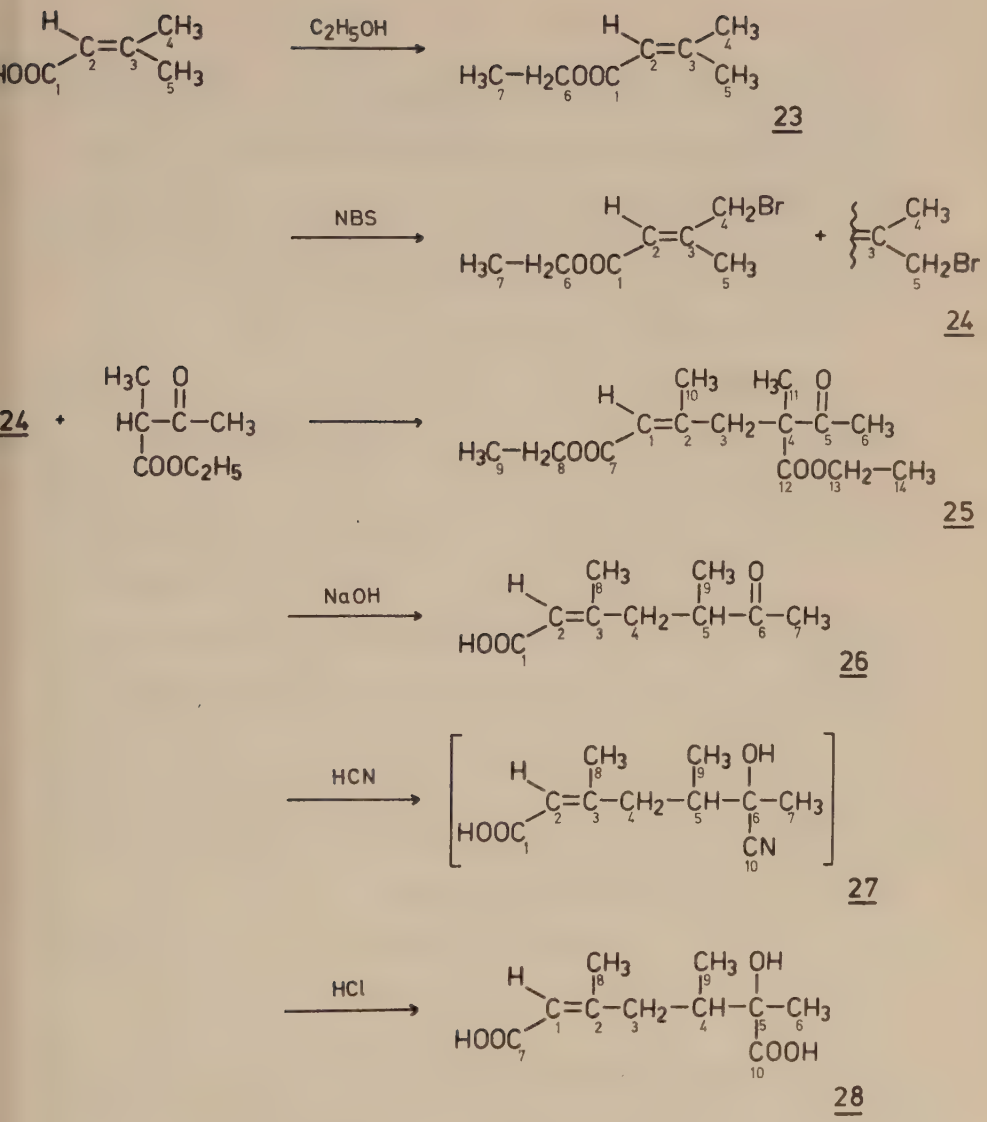


Abb.26. Synthese der 5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure

8. ANALYTIK

Eine analytische Untersuchung der qualitativen und quantitativen Alkaloidzusammensetzung von Senecio doronicum erschien aus zwei Gründen geboten:
Zum Ersten wird Senecio doronicum auch heute noch in der Volksheilkunde als Asthmamittel verwendet, wodurch eine Gefahr der Intoxikation mit Pyrrolizidinalkaloiden gegeben ist.
Zum Zweiten sollen die möglichen Auswirkungen der unterschiedlichen geobotanischen Voraussetzungen der beiden Sammelgebiete aufgezeigt werden. Während, wie in Kap. 4. erwähnt, Senecio doronicum in Vent auf saurem Urgestein bei rauhem Klima wächst, gedeiht sie am Mte. Baldo auf Kalkgestein bei wesentlich milderen Bedingungen. Es ist anzunehmen, daß diese verschiedenen Wachstumsbedingungen der beiden Standorte das qualitative und quantitative Verteilungsmuster der Alkaloide in der Pflanze beeinflussen.

Es wird deshalb eine gaschromatographische analytische Methode erarbeitet, die einen schnellen und sicheren Nachweis sowie eine quantitative Bestimmung der beiden Alkaloide Doronenin und Bulgarsenin aus Pflanzenextrakten erlaubt.

8.1. Gaschromatographische Analyse

Für die Gaschromatographie steht ein Gaschromatograph vom Typ Aerograph 2800 der Fa. Varian zur Verfügung. Ein Linienschreiber derselben Firma, Typ A25, dient zur Registrierung.
Als Trägergas findet nachgereinigter Stickstoff, als Brenngas

ein Preßluft-Wasserstoff-Gemisch Verwendung. Die Markierung der Einzelsubstanzen erfolgt mit einem Flammenionisationsdetektor. Als Trennsäule wird eine Glassäule, die mit 3% SE auf Varaport 30 gepackt ist, verwendet. Sie gewährleistet erfahrungsgemäß für Pyrrolizidinalkaloide mit hohem Molekulargewicht die höchste Trennleistung bei gleichzeitigen äußerst schonenden Bedingungen.

8.1.1. Qualitative GC-Analyse

Da sich die beiden Alkaloide nur durch eine Doppelbindung im Necin unterscheiden, muß mit sehr ähnlichen Retentionszeiten gerechnet werden.
Um eine optimale gaschromatographische Trennung zu erzielen, werden zunächst die Alkaloide einzeln untersucht. Hierbei zeigt sich, daß die größte Differenz in den Retentionszeiten bei einer isothermen Säulentemperatur von 200°C erreicht wird. Der RT-Wert für Doronenin beträgt 24.6, für Bulgarsenin 25.8 min. Als innerer Standard wird Acetylcodein verwendet, das eine Retentionszeit von 39.4 min aufweist. Die Trennleistung kann durch Erstellen eines Aufheizprogramms nicht verbessert werden.
Die GC-Analyse des Alkaloidgemisches zeigt nicht die aus den Vorversuchen zu erwartende gute Trennung. Unabhängig vom Konzentrationsverhältnis der beiden Alkaloide verlängert sich die Retentionszeit von Doronenin auf 25.0 min, so daß die beiden Signale fast zusammenfallen. Als Ursache hierfür ist möglicherweise eine intermolekulare Bildung von Wasserstoffbrücken anzusehen.
Die eindeutige Zuordnung der beiden Signale des Alkaloidgemisches

wird durch Konzentrationserhöhung der Einzelsubstanzen erreicht, was eine Vergrößerung des jeweiligen Peaks zur Folge hat.

Nach der Festlegung des Standards und der Zuordnung der Retentionszeiten werden die Alkaloid-Rohextrakte gaschromatographisch untersucht. Aufgrund der RT-Werte werden die Alkaloide Doronenin und Bulgarsenin in den drei Rohextrakt-Chromatogrammen - Vent 1977, Vent 1978, Mte. Baldo 1978 - als Alkaloide identifiziert. Die unterschiedliche quantitative Zusammensetzung der Rohextrakte läßt sich aus den verschieden großen Peakflächen optisch ermitteln.

Da sich die Chromatogramme der drei Alkaloid-Rohextrakte gleichen, ist lediglich das Ergebnis der GC-Analyse des Rohextraktes - Vent 1978 - in Abbildung 27 wiedergegeben.

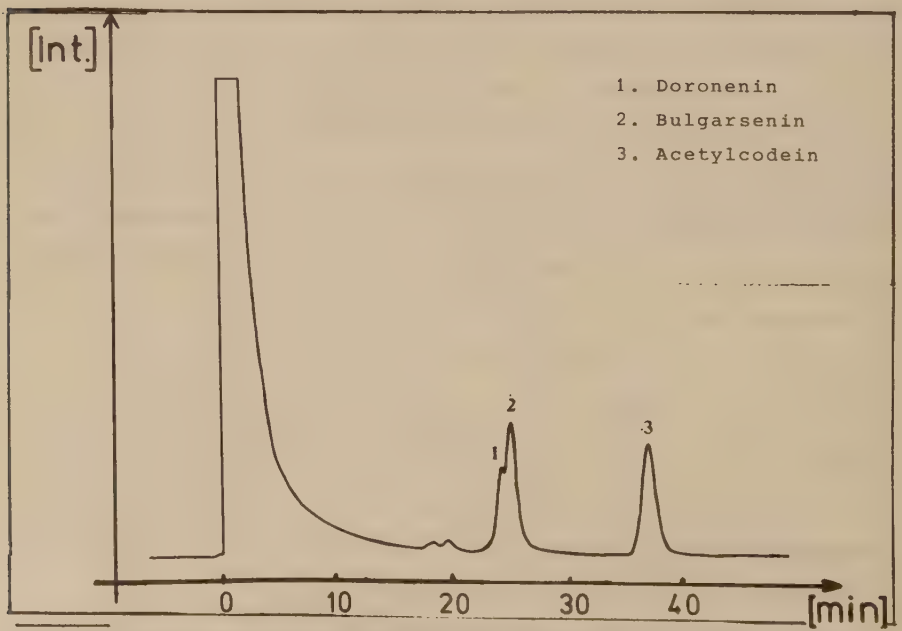


Abb.27. Gaschromatogramm des Alkaloid-Rohextraktes - Vent 1978 - von Senecio doronicum und des Standards

8.1.2. Quantitative GC-Analyse

Nach dem unter Kap.5. ausführlich beschriebenen Extraktions- und Aufarbeitungsverfahren werden aus den oberirdischen Teilen von Senecio doronicum, unabhängig vom Standort, ca. 0.30% Alkaloid-Rohextrakt, bezogen auf die getrocknete und gepulverte Droge, gewonnen. Die Auswertung der Chromatogramme ergibt demnach, ebenfalls auf die getrocknete und gepulverte Droge bezogen, folgende prozentuale Gehalte:

	Doronenin	Bulgarsenin	Gesamtalkaloidgehalt
Vent 1977	0.052 $\pm$ 0.0041	0.061 $\pm$ 0.0049	0.113 $\pm$ 0.009
Vent 1978	0.053 $\pm$ 0.0042	0.074 $\pm$ 0.0059	0.127 $\pm$ 0.010
Mte. Baldo 1978	0.034 $\pm$ 0,0027	0.105 $\pm$ 0.0084	0.139 $\pm$ 0.011

8.2. Potentiometrische Titration

Da bei der GC-Analyse lediglich die Alkaloide, nicht aber ihre N-Oxide nachgewiesen und bestimmt werden, soll durch eine potentiometrische Titration der prozentuale Gehalt an N-Oxiden im Rohextrakt ermittelt werden. Diese Bestimmungsmethode liefert allerdings nur die Gesamtgehalte an Alkaloiden und ihren N-Oxiden.

Nach *Muth* [60] können stickstoffhaltige Aromaten und ihre N-Oxide im wasserfreien Milieu nebeneinander bestimmt werden. Nach der Ermittlung des Gehaltes an freien Basen durch Titration in Eises-

60) *C.W.Muth, R.S.Darlak, W.H.English* und *A.T.Hamner*, Anal.Chem. 34, 1163 (1962)

sig mit Perchlorsäure wird die austitrierte Lösung mit Acetanhydrid versetzt, das sofort protoniert wird und mit N-Oxiden nach der in Abb.28 angegebenen Umsetzung reagiert.

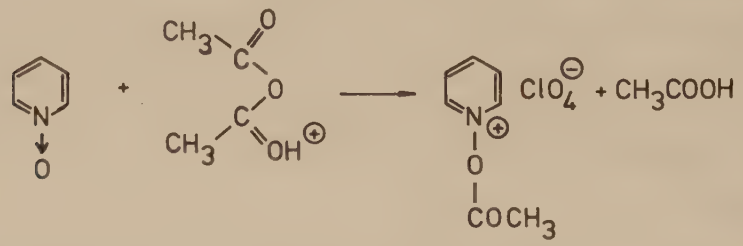


Abb.28. Wasserfreie Titration aromatischer N-Oxide

Es gelang nicht, nach dieser Methode reproduzierbare Werte für den Gehalt an Alkaloiden und deren N-Oxiden zu erhalten.
Aus diesem Grunde wird eine potentiometrische Titration im wässrigen Milieu mit Salzsäure durchgeführt. Hierbei ist es nicht möglich, den Gehalt an Alkaloiden und ihren N-Oxiden in einer Bestimmung zu ermitteln. In einer Titration werden zunächst nur die Alkaloide bestimmt, indem der genau eingewogene Alkaloid-Rohextrakt in Ethanol gelöst und mit HCl titriert wird. In einer zweiten Titration wird der Gesamtgehalt an Alkaloiden und ihren N-Oxiden ermittelt. Hierbei werden die N-Oxide durch Reduktion mit einem überschüssigen Zink/Salzsäure-Gemisch in ihre Alkaloid-Basen überführt. Diese werden aus der ammoniakalisch gemachten Mischung mit Dichlormethan ausgeschüttelt und anschließend mit Salzsäure titriert. Der Alkaloid-N-Oxid-Gehalt berechnet sich aus der Differenz der beiden Titrationen.
Die Bestimmung wird nur für den Alkaloid-Rohextrakt - Vent 1978 - durchgeführt. Es werden Gehalte von 19.43% an Alkaloiden und

22.49% an N-Oxiden ermittelt. Der Gesamtgehalt, bezogen auf den Rohextrakt, beträgt 41.92%, berechnet auf die getrocknete und pulverisierte Droge 0.126%. Dieser Wert stimmt mit dem Ergebnis der GC-Analyse überein.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von Alkaloidinhaltsstoffen aus Senecio doronicum sowie der Synthese zweier Necinsäuren.

Die wesentlichen Ergebnisse sind im folgenden aufgeführt:

1) Aus der Droge wird ein Alkaloid-Rohextrakt gewonnen, aus dem mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie zwei Alkaloide isoliert werden.

2) Die Struktur der Alkaloide wird anhand von IR-, Massen-, ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren aufgeklärt. Beide Alkaloide stellen danach cyclische Diester aus der Pyrrolizidinalkaloidreihe dar. Es handelt sich einmal um ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebenes Alkaloid, dem der Name Doronenin gegeben wird, sowie um das bereits bekannte Bulgarsenin.
In der ^{1}H-NMR-Spektroskopie wird durch Einstrahlexperimente erstmals eine komplette und eindeutige Zuordnung der Protonen beider Alkaloide erhalten. Über das entkoppelte und off-resonance entkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum wird ebenfalls erstmals die exakte Festlegung der C-Atome beider Alkaloide erzielt.

3) Die Struktur der isolierten Necinsäure wird ebenfalls spektroskopisch aufgeklärt. Die Säure beider Alkaloide ist identisch. Sie ist in der Literatur als Nemorensinsäure beschrieben und gehört zur Gruppe der C_{10}-Dicarbonsäuren. Anhand des Massenspektrums wird erstmalig ein Fragmentierungsschema aufgestellt. Durch die Aufnahme eines entkoppelten und off-resonance entkoppelten ^{13}C-NMR-Spektrums wird erstmals die eindeutige Zuordnung der C-Atome gewährleistet.

4) Es wird ein Syntheseweg zur Darstellung der offenkettigen Form der Nemorensinsäure und einer weiteren C_{10}-Dicarbonsäure erarbeitet.

5) Mittels der Gaschromatographie wird eine analytische Methode beschrieben, die einen schnellen und sicheren qualitativen Nachweis sowie eine quantitative Bestimmung der genannten Alkaloide aus Pflanzenextrakten erlaubt.

6) Es wird ein acidimetrisches Verfahren mit potentiometrischer Detektion erarbeitet, das eine Gehaltsbestimmung der Alkaloide und ihrer N-Oxide aus Pflanzenextrakten ermöglicht.

10. EXPERIMENTELLER TEIL

10.1. Allgemeine Angaben

Bei der Säulenchromatographie wird als stationäre Phase Kieselgel 60, Korngröße 60 Å der Fa. Merck verwendet.
Zur Dünnschichtchromatographie dienen sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke Kieselgel-Fertigplatten (Kieselgel 60, F_{254}, Schichtdicke 0.25 mm) der Fa. Merck.
Als Auftragsgeräte finden der Microdoser nach Dibbern der Fa. Desaga, ausgestattet mit einer 500 µl Hamilton-Spritze, und der Linomat III der Fa. Camag, versehen mit einer 100 µl Hamilton-Spritze, Verwendung.
Zur Detektion mit Dragendorff's Reagenz dienen:

Dragendorff A:	Wismutnitrat	0.85 g
	Essigsäure	10.0 ml
	Wasser	40.0 ml
Dragendorff B:	Kaliumiodid	8.0 g
	Wasser	20.0 ml

Bei Bedarf werden Dragendorff A und B zu gleichen Teilen gemischt.

Zur Detektion nach *Dann* werden drei Reagenzlösungen verwendet:

1) H_2O_2, 30%
2) Acetanhydrid 1 Teil
   Benzin (80-100°C) 4 Teile
   Benzol 5 Teile
3) p-Dimethylaminobenzaldehyd 1.0 g
   Ethanol, 90% 70 ml
   Diethylenglykolmonoethylether 30 ml
   Salzsäure, 37% 1.5 ml

Die IR-Spektren werden als KBr-Preßlinge auf einem Spektrometer IR-20 A der Fa. Beckmann aufgenommen.
Die Massenspektren werden bei einer Emission von 70 eV und einer Quellentemperatur von 200°C auf einem MS 50 der Fa. A.E.I. angefertigt.
Die ^{1}H-NMR-Spektren der Alkaloide und der Necinsäure werden auf einem Gerät WH 90, 90 MHz, der Fa.Bruker aufgenommen. Die Spektren aller übrigen Substanzen werden auf einem Spektrometer T 60 der Fa. Varian vermessen. Lösungsmittel ist $CDCl_3$, innerer Standard TMS. Ausgetauscht wird mit D_2O.
Die ^{13}C-NMR-Spektren werden auf einem Bruker WH 90, 22.63 MHz, aufgenommen. Lösungsmittel für die Aufnahme der Alkaloide ist $CDCl_3$ und für die Necinsäure DMSO. Innerer Standard ist TMS.

Die Schmelzpunkte werden auf einem Kofler-Mikroskopiergerät der Fa. Reichert unkorrigiert bestimmt.
Zur Messung der spezifischen Drehung steht ein Polarimeter 241 der Fa. Perkin Elmer zur Verfügung. Die unten angegebenen Stammlösungen enthalten Ethanol als Lösungsmittel:

Doronenin: 58.8 mg/5.0 ml

Bulgarsenin: 51.4 mg/5.0 ml

Zur Erstellung der Verdünnungsreihen dienen folgende Gemische: 1.0/1.0; 0.5/1.0; 0.5/1.5; 0.5/2.0; 0.5/2.5; 0.5/3.0 ml Stammlösung/ml Ethanol.
Es werden jeweils fünf Messungen in einer 1 ml Küvette bei 20°C unter Verwendung der D-Linie des Natriumlichtes gegen Ethanol durchgeführt. Die Meßdauer beträgt 5 sec. Die Ergebnisse sind durch Regressionsgeraden in den Abb. 4 und 5 wiedergegeben.

Für die Messung der spezifischen Drehung der Nemorensinsäure wird

keine Verdünnungsreihe erstellt. Es wird lediglich die Stammlösung, 6.5 mg/1.0 ml Ethanol, und ein Gemisch aus gleichen Teilen Stammlösung und Ethanol wie oben beschrieben gemessen.

10.2. Beschreibung der Versuche zu Kap.7.

Tiglinsäureethylester (12)

100.0 g (1.0 mol) Tiglinsäure werden mit 80.5 g (1.75 mol) Ethanol unter Zusatz von 5.0 g p-Toluolsulfonsäure am Wasserabscheider 24 h in CCl_4 gekocht. Der Katalysator wird mit Wasser und gesättigter Bicarbonatlösung ausgewaschen, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Ester ohne Aufarbeitung verwendet.

Ausb.: 102.4 g (80% d.Th.)

^{1}H-NMR: δ= 6.80 (m, 1H, C-3), 4.15 (q, 2H, C-6), 1.85 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-4), 1.78 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-5), 1.30 (t, 3H, C-7)

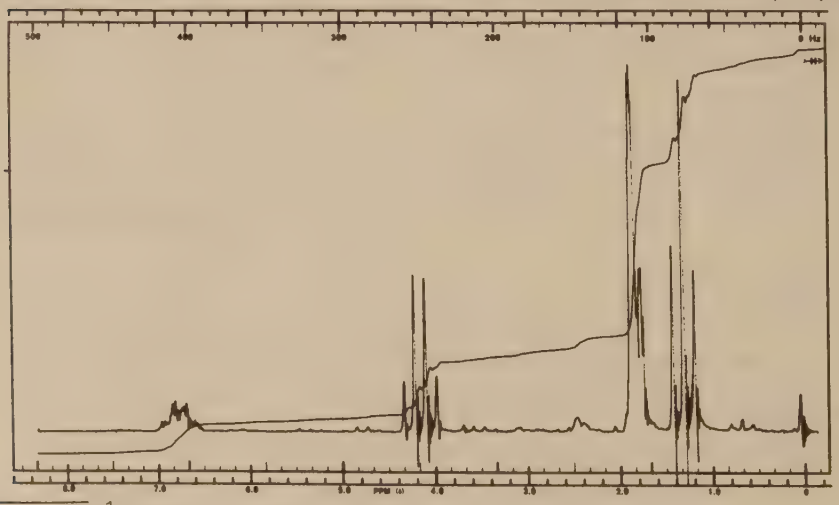


Abb.29. ^{1}H-NMR-Spektrum von 12

β,γ-Bromtiglinsäureethylester-Gemisch (13)

102.4 g (0.8 mol) 12 werden in 800 ml über P_2O_5 getrocknetem CCl_4 gelöst. Nach Zugabe von 141.8 g (0.79 mol) NBS und 1.6 g Azo-bis-isobutyronitril als Katalysator wird unter Rückfluß leicht erwärmt. Nach dem Abklingen der anfänglich stürmischen Reaktion wird stärker erwärmt. Die Reaktion ist nach 1 h beendet. Das Succinimid wird abgetrennt und ausgewaschen, das CCl_4 abgezogen und das Produkt i.Vak. destilliert.

Ausb.: 94.4 g (57.0% d.Th.)

$Sdp._{16}$: 120°C

IR: 1735 (α,β-ungesättigter Ester), 1650 cm^{-1} (Doppelbindung)

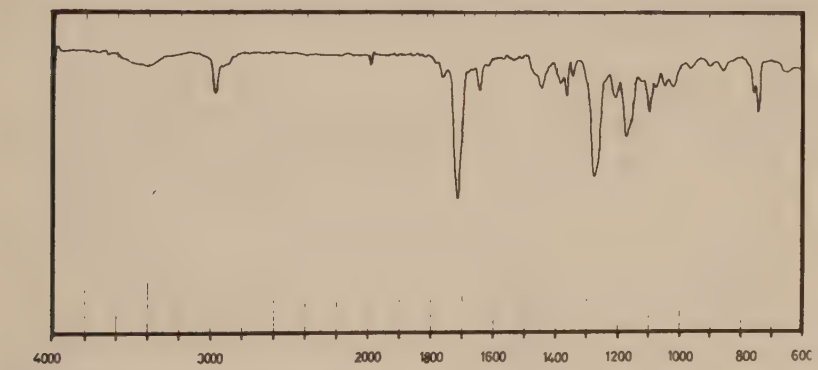


Abb.30. IR-Spektrum von 13

^{1}H-NMR: β-Form: δ= 3.98 (m, 2H, C-5), 2.02 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-4)

γ-Form: δ= 4.22 (m, 2H, C-4), 1.95 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-5)

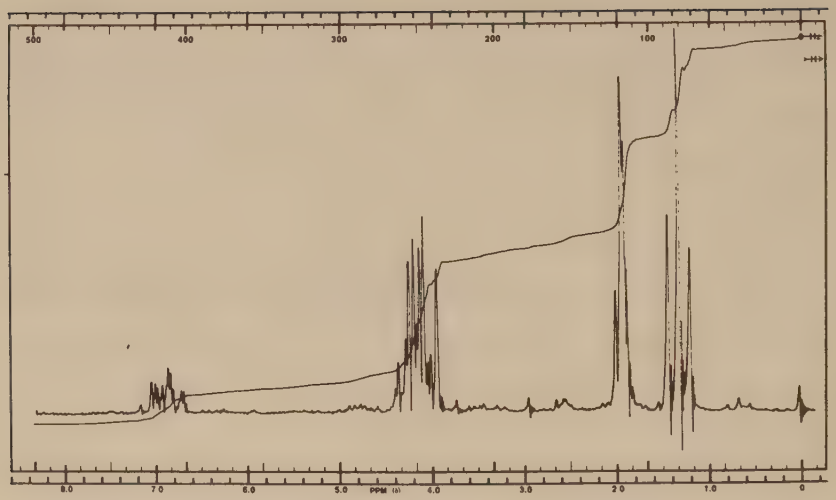


Abb.31. ^{1}H-NMR-Spektrum von 13

5-Methyl-6-oxo-2-hepten-2,5-dicarbonsäurediethylester (14)

Zu 250 ml einer 0.5molaren Natriumethylatlösung werden in der Siedehitze 64.8 g (0.45 mol) α-Methylacetessigsäureethylester und danach 94.4 g (0.46 mol) 13 vorsichtig unter starkem Rühren und unter Rückfluß zugetropft. Nach 12 h Kochen wird der Alkohol abdestilliert, das ausgefallene NaBr in Eiswasser aufgenommen und das Reaktionsprodukt ausgeethert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird der Ether am Rotationsverdampfer abgezogen und die Substanz 14 durch Destillation im Hochvakuum gereinigt.

Ausb.: 7.8 g (6.4% d.Th.)

$Sdp._{0.02}$: 88-89°C

IR: 1740 (gesättigter Ester), 1720 (α,β-ungesättigter Ester), 1710 (C=O), 1655 cm^{-1} (C=C-Bindung)

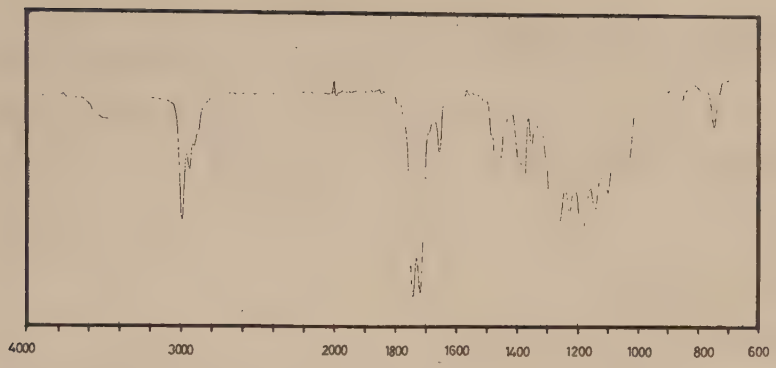


Abb.32. IR-Spektrum von 14

^{1}H-NMR: δ= 6.68 (m, 1H, C-3), 4.17 (m, 4H, C-9, C-13), 2.76 (dd, J= 8.0 Hz, J= 3.0 Hz, 2H, C-4), 2.18 (s, 3H, C-7), 1.88 (m, 3H, C-1), 1.40 (s, 3H, C-11), 1.30 (dt, 6H, C-10, C-14)

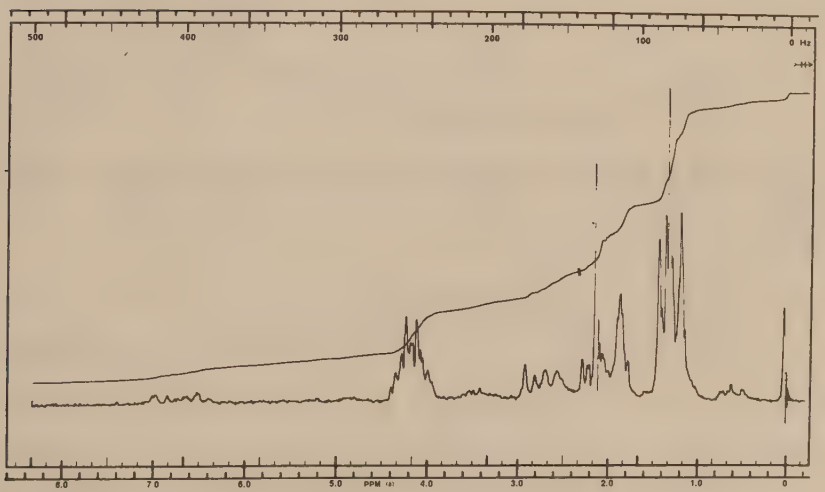


Abb.33. ^{1}H-NMR-Spektrum von 14

2,5-Dimethyl-6-oxo-2-heptensäure (15)

7.8 g (0.029 mol) 14 werden in 100 ml 20%iger Salzsäure 24 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird ausgeethert. Die vereinigten Etherfraktionen werden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingedampft. Ein gelblich gefärbtes Öl wird erhalten, das zu 16 weiterverarbeitet wird.

Ausb.: 3.8 g (48.7% d.Th.)

^{1}H-NMR: δ= 11.2 (s, COOH, C-1)

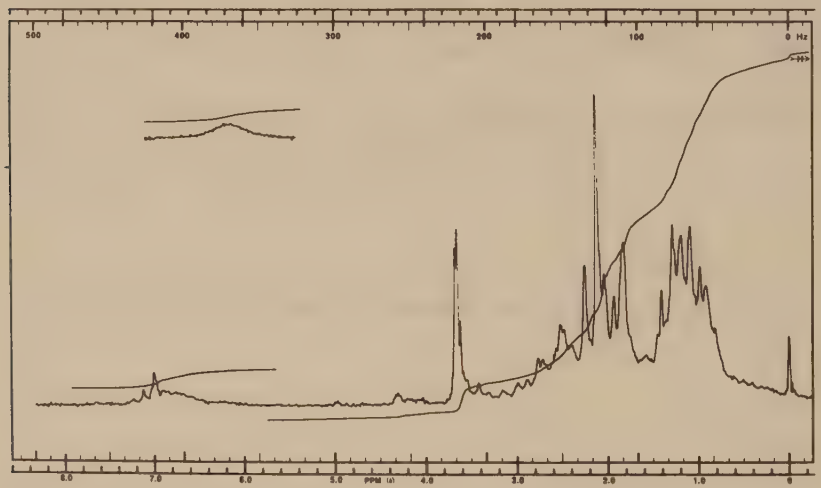


Abb.34. ^{1}H-NMR-Spektrum von 15

6-Cyan-6-hydroxy-2,5-dimethyl-2-heptensäure (16)

0.98 g (0.02 mol) NaCN werden in 15 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 3.8 g (0.022 mol) 15 wird auf -5°C abgekühlt. Unter kräftigem Rühren wird die Lösung mit 0.017 mol 35%iger H_2SO_4 derart versetzt, daß die Temperatur 0°C nicht übersteigt. Nach 15 min Rühren ohne Kühlung wird das Cyanhydrin ausgeethert. Die Etherextrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingeengt. Bei der Destillation des mit zwei Tropfen H_3PO_4 versetzten

Cyanhydrins tritt vollständige Zersetzung ein. Die Spektren stammen von dem rohen Nitril.

^{1}H-NMR: δ= 7.10 (m, 1H, C-3), 4.04 (s, OH, C-6)

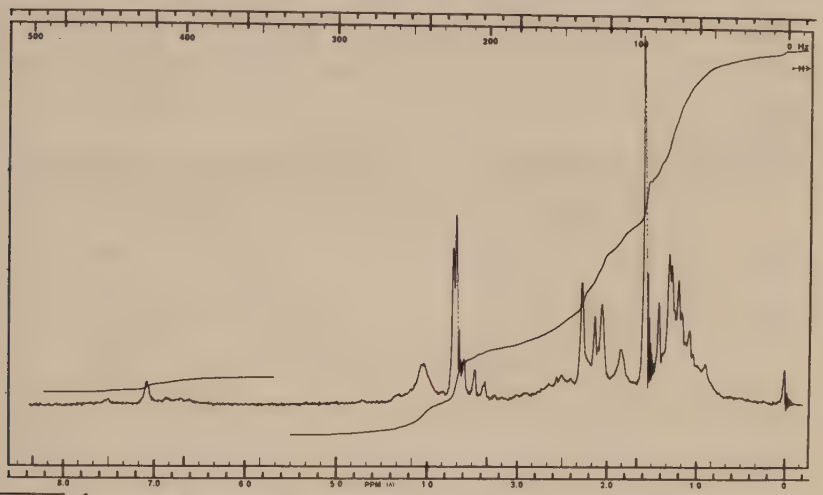


Abb.35. ^{1}H-NMR-Spektrum von 16

3,3-Dimethylacrylsäureethylester (23)

250.0 g (2.5 mol) 3,3-Dimethylacrylsäure werden mit 201.25 g (4.375 mol) Ethanol unter Zusatz von 12.5 g p-Toluolsulfonsäure am Wasserabscheider 24 h in CCl_4 gekocht. Anschließend wird der Katalysator mit Wasser und gesättigter Bicarbonatlösung entfernt, das CCl_4 am Rotationsverdampfer abgezogen und der Ester i.Vak. destilliert.

Ausb.: 284.0 g (88.8% d.Th.)

$Sdp._{16}$: 52°C

IR: 1650 (C=C-Bindung), 1710 cm^{-1} (α,β-ungesättigter Ester)

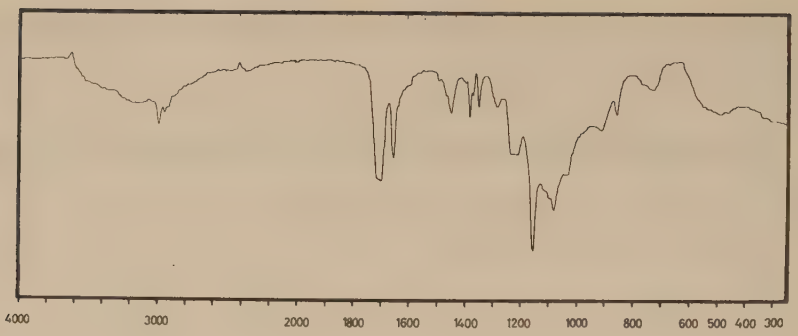


Abb.36. IR-Spektrum von 23

^{1}H-NMR: δ= 5.65 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-2), 4.10 (q, 2H, C-6), 2.18 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-4), 1.90 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-5)

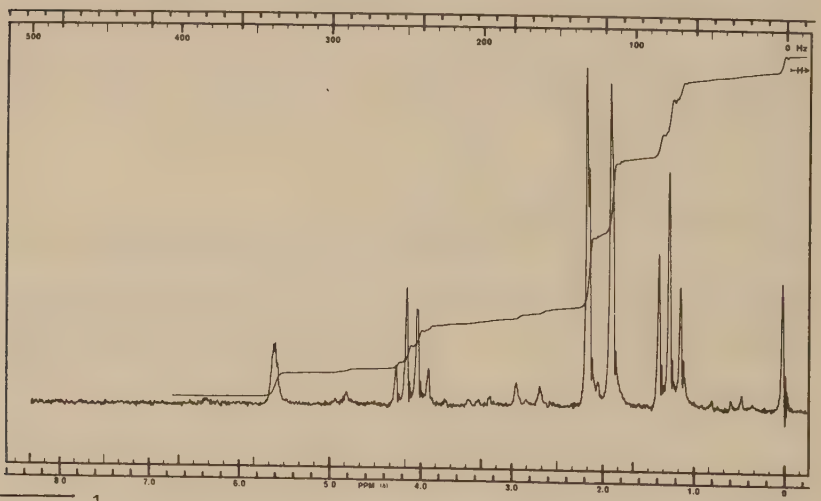


Abb.37. ^{1}H-NMR-Spektrum von 23

$C_7H_{12}O_2$ (128.2) Gef.: Mol-Masse 128 (MS)

4-Brom-3-methyl-2-butensäureethylester (24)

284.0 g (2.22 mol) 23 werden in 1.5 l über P_2O_5 getrocknetem CCl_4 gelöst. Nach Zugabe von 394.9 g (2.2 mol) NBS und 4.5 g Azo-bis-isobutyronitril als Katalysator wird unter Rückfluß leicht erwärmt. Die Reaktion setzt sehr stürmisch an, klingt dann jedoch ab, so daß stärker erwärmt werden muß. Nach 1.5 h wird abgekühlt, das Succinimid abgesaugt und mit CCl_4 nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Reaktionsprodukt i.Vak. durch Destillation gereinigt.

Ausb.: 295.3 g (64.4% d.Th.)

$Sdp._{16}$: 118°C

IR: 1650 (C=C-Bindung), 1710 cm^{-1} (α,β-ungesättigter Ester)

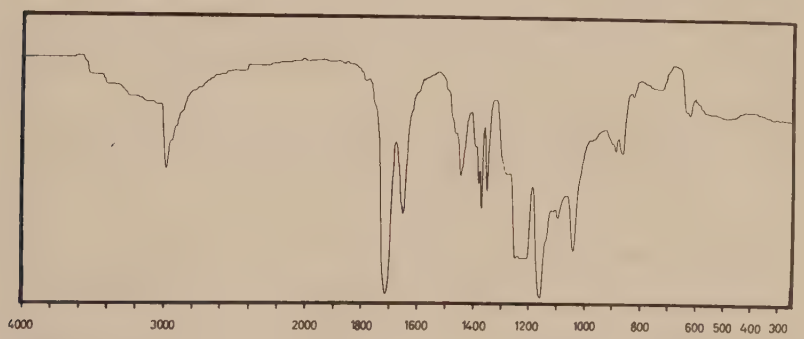


Abb.38. IR-Spektrum von 24

^{1}H-NMR: trans-Form: δ= 5.94 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-2), 4.59 (s, 2H, C-4), 2.10 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-5), 4.17 (q, 2H, C-6), 1.31 (t, 3H, C-7)

cis-Form: δ= 5.74 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-2), 3.95 (s, 2H, C-5), 2.28 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-4), 4.17 (q, 2H, C-6), 1.31 (t, 3H, C-7)

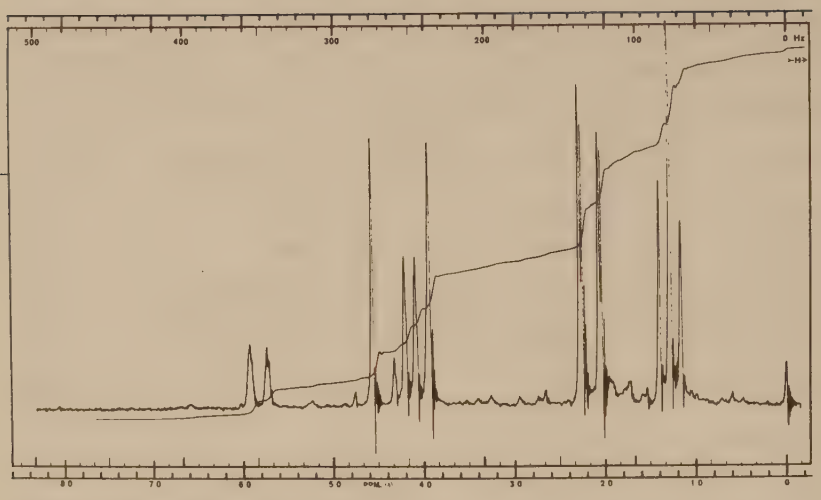


Abb.39. ^{1}H-NMR-Spektrum von 24

$C_7H_{11}BrO_2$ (207.1) Gef.: Mol-Masse 207 (MS)

2,4-Dimethyl-5-oxo-1-hexen-1,4-dicarbonsäurediethylester (25)

Zu 72.2 g (0.5 mol) α-Methylacetessigsäureethylester und 0.5 g (1 mol%) des Katalysators Dibenzo[18]krone-6 werden bei -10°C unter starkem Rühren 250 ml 50%ige NaOH hinzugetropft. Anschließend werden 103.5 g (0.5 mol) 24, verdünnt in 250 ml Benzol, vorsichtig hinzugegeben, wobei durch Kühlung eine Temperaturerhöhung vermieden wird. Nach beendeter Zugabe wird langsam bis auf Raumtemperatur erwärmt und 14 h lang gerührt. 25 wird mit Ether extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und nach Abziehen des Extraktionsmittels i.Vak. destilliert.

Ausb.: 64.8 g (48.0% d.Th.)

Sdp.$_{0.05}$: 65-108°C

IR: 1750 (ges. Ester), 1735 (α,β-ungesättigter Ester), 1710 (C=O), 1650 cm^{-1} (C=C-Bindung)

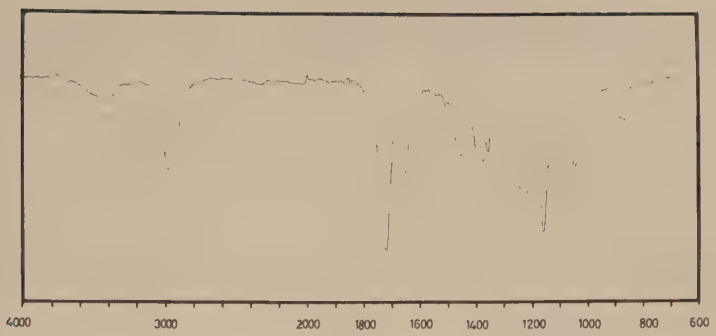


Abb.40. IR-Spektrum von 25

^{1}H-NMR: δ= 5.65 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-1), 4.18 (dq, 4H, C-8, C-13), 2.75 (s, 2H, C-3), 2.22 (s, 3H, C-6), 2.10 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-10), 1.38 (s, 3H, C-11), 1.30 (dt, 6H, C-9, C-14)

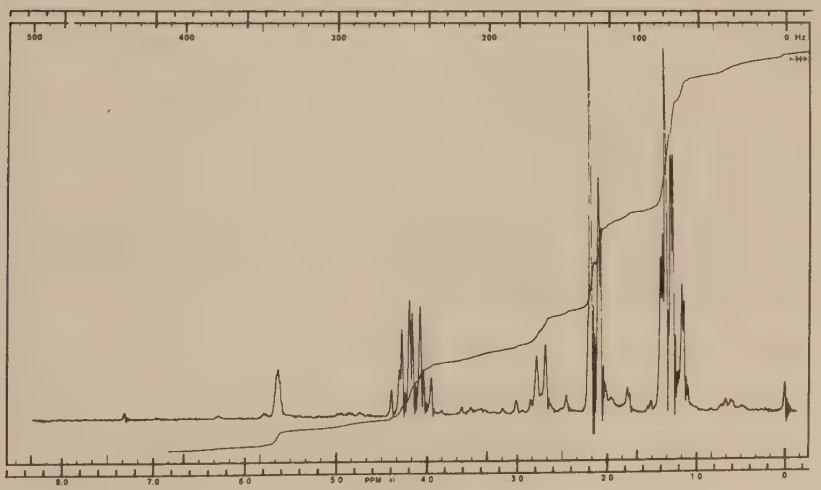


Abb.41. ^{1}H-NMR-Spektrum von 25

$C_{14}H_{22}O_5$ (270.3) Gef.: Mol-Masse 270 (MS)

3,5-Dimethyl-6-oxo-2-heptensäure (26)

64.8 g (0.24 mol) 25 werden nach Zugabe von 250 ml 5%iger NaOH durch 6 h Rühren bei Raumtemperatur und anschließendem Erhitzen unter Rückfluß quantitativ verseift und in 2-Stellung zur Ketogruppe decarboxyliert. Nach dem Abkühlen wird angesäuert und mit Ether extrahiert. Die etherische Lösung wird über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und das zurückbleibende Öl ausgefroren. 26 wird als weißes, amorphes Pulver erhalten.

Ausb.: 32.7 g (80.1% d.Th.)

Schmp.: 92-94°C

IR: 3000 (OH), 1690 (α,β-ungesättigte Carbonsäure), 1650 cm^{-1} (C=C-Bindung)

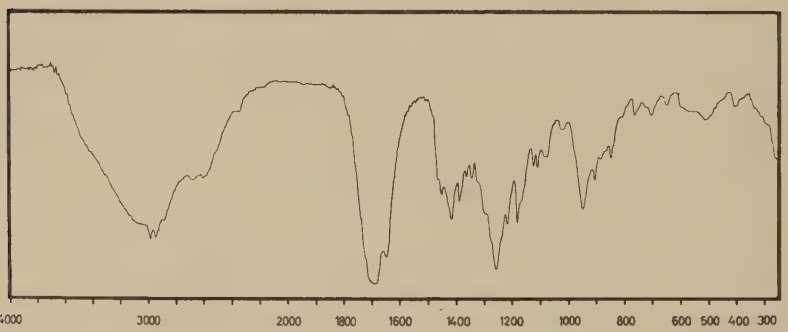


Abb.42. IR-Spektrum von 26

^{1}H-NMR: δ= 8.60 (s, 1H, C-1), 5.75 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-2), 2.58 (m, 3H, C-4, C-5), 2.22 (s, 3H, C-7), 2.15 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-8), 1.20 (d, J= 6.0 Hz, 3H, C-9)

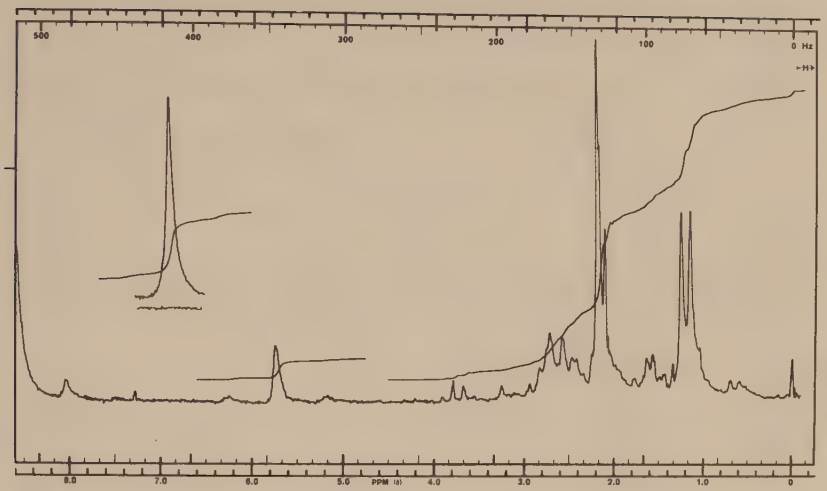


Abb.43. ^{1}H-NMR-Spektrum von 26

$C_9H_{14}O_3$ (170.2) Gef.: Mol-Masse 170 (MS)

6-Cyan-6-hydroxy-3,5-dimethyl-2-heptensäure (27)

Zu einer Lösung von 0.49 g (0.01 mol) NaCN in 10 ml Wasser werden 2.04 g (0.012 mol) 26 gegeben und auf -5°C gekühlt. Unter starkem Rühren werden 0.0085 mol 35%ige H_2SO_4 langsam zugetropft, wobei die Temperatur 0°C nicht übersteigen darf. Danach wird ohne Kühlung 15 min gerührt. Da das entstandene Cyanhydrin instabil ist, wird auf eine weitere Reinigung verzichtet.

IR: 3500 (OH), 3000 (COOH), 1700 (α,β-ungesättigte Carbonsäure), 1640 cm^{-1} (C=C-Bindung)

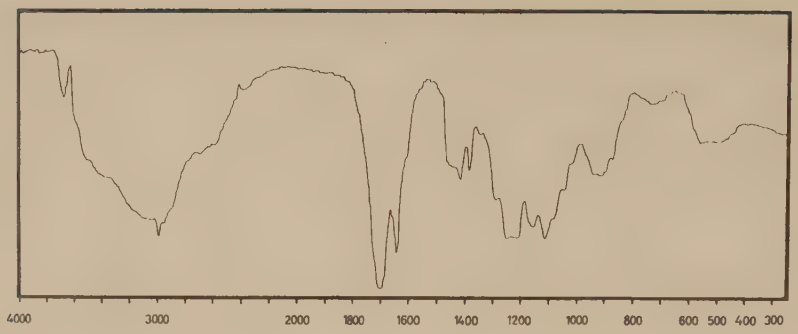


Abb.44. IR-Spektrum von 27

^{1}H-NMR: δ= 8.60 (s, 1H, C-1), 5.75 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-2), 2.74 (m, 3H, C-4, C-5), 2.15 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-8), 1.20 (d, J= 6.0 Hz, 3H, C-9), 1.20 (s, 3H, C-7)

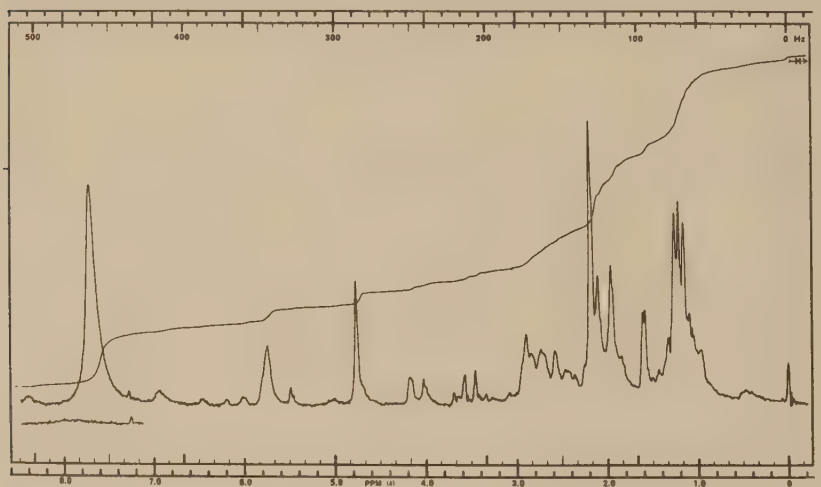


Abb.45. ^{1}H-NMR-Spektrum von 27

5-Hydroxy-2,4-dimethyl-1-hexen-1,5-dicarbonsäure (28)

Zu dem rohen Cyanhydrin 27 werden 5 ml konz. HCl gegeben. Die Lösung wird 12 h in der Kälte gerührt, dann 6 h auf 100°C erwärmt. Nach Ausethern, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen der etherischen

Lösung fällt 28 aus einem Petrolether/Aceton-Gemisch ölig an.

Ausb.: 0.13 g

IR: 3400 (OH), 3000 (OH der Carbonsäure), 2980 (CH), 1700 (COOH), 1640 cm^{-1} (C=C-Bindung)

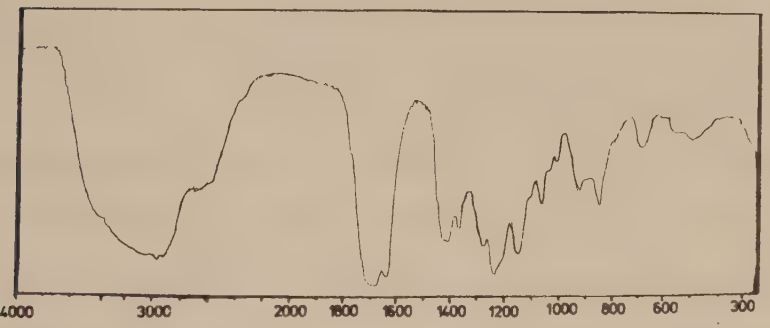


Abb.46. IR-Spektrum von 28

^{1}H-NMR: δ= 5.95 (d, J= 1.5 Hz, 1H, C-1), 5.20 (OH, C-5), 2.76 (m, 3H, C-3, C-4), 2.12 (d, J= 1.5 Hz, 3H, C-8), 1.29 (d, J= 6.0 Hz, 3H, C-9), 1.25 (s, 3H, C-6)

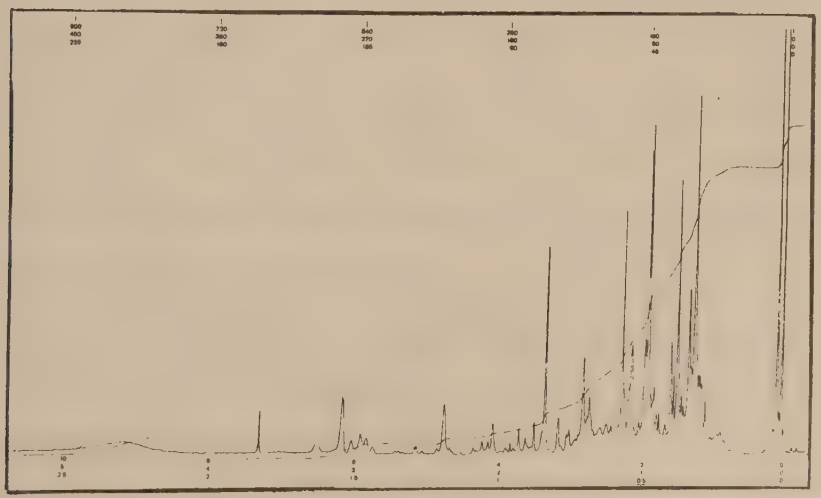


Abb.47. ^{1}H-NMR-Spektrum von 28

$C_{10}H_{16}O_5$ (216.1) Gef.: Mol-Masse 216 (MS)

10.3. Beschreibung der Versuche zu Kap.8.

Bei der gaschromatographischen Analyse findet ein Gaschromatograph vom Typ Aerograph 2800 der Fa. Varian Verwendung. Als Trennsäulen dienen Glassäulen von 1.8 m Länge und 2 mm Durchmesser. Sie sind mit 3% SE auf Varaport 30, 80/100 mesh, gepackt. Die beste Trennung wird erzielt bei einer Säulen- und Injektortemperatur von 205°C und einer Detektortemperatur von 250°C. Der Stickstoffluß beträgt 23 ml/min.

Bei der Herstellung der Stammlösungen der beiden Alkaloide und des Standards Acetylcodein dient Methanol als Lösungsmittel. Es werden jeweils genau 1.3 mg Substanz eingewogen und auf 10 ml gelöst.

Die Auswertung der Peakflächen erfolgt mit einem Scheibenroll-Planimeter der Fa. Ott. Durch dreimaliges Ausmessen und anschließender Mittelwertbildung wird der Fehler mit ca. 8% gering gehalten.

Zur Ermittlung der Retentionszeiten der Einzelsubstanzen werden jeweils 0.5, 0.75 und 1.0 ml der betreffenden Alkaloid-Stammlösung zu 0.5 ml Standard-Lösung und mit Methanol auf die Einspritzmenge von 2 µl aufgefüllt. Die drei Retentionszeiten innerhalb der beiden Versuchsreihen sind identisch.

Da die Peaks des Doronenins und des Bulgarsenins bei den Chromatogrammen des Gemisches dicht beieinanderliegen, kann nur eine resultierende Grenzfläche ermittelt werden, die sich apparativ

nicht aufteilen läßt. Es wird daher nachträglich eine Flächenbegrenzung vorgenommen. Wie die Versuche mit den Einzelsubstanzen zeigen, steigen die Peaks der Alkaloide gleichartig an. Es wird demnach in dem Chromatogramm des Gemisches eine zum Doronenin-Peak parallel verschobene Ansteiglinie zu dem Peakansatz von Bulgarsenin gezogen, dessen Fläche B nun ausgemessen werden kann. Die Teilfläche A' des Doronenins wird ebenfalls gemessen und mit einem Faktor korrigiert. Es wird so die reelle Fläche A von Doronenin erhalten (vgl. hierzu Abb.27).

Zur Ermittlung des Faktors werden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die in Tabelle 10 und 11 wiedergegeben sind.

Bei der Versuchsreihe 1 werden konstant 2 µl eingespritzt. Die Standardmenge beträgt jeweils 0.50 µl, während das Verhältnis der Alkaloid-Stammlösungen zwischen 0.5 und 1.0 µl wechselseitig variiert. Methanol dient als Auffüllsubstanz. Die Auswertung der in Tabelle 10 wiedergegebenen Ergebnisse ergibt für die relativen Peakflächen, d.h. auf 0.5 µl Einspritzmenge bezogenen Flächen, das Verhältnis St:B:A'= 3.26:2.32:1.00 bzw. St:B= 1.41:1.00. D.h., bezogen auf die gleichen Einspritzmengen an Alkaloiden und Standard ist die Bulgarsenin-Fläche B 2.32 mal größer als die Teilfläche A' von Doronenin. Dieser Faktor ändert sich nicht bei einer Konzentrationsänderung von Bulgarsenin gegenüber Doronenin bzw. umgekehrt.

Bei der Versuchsreihe 2 wird ein Gemisch, bestehend aus Methanol und den drei Stammlösungen von Doronenin, Bulgarsenin und Standard zu gleichen Teilen hergestellt. Die Einspritzmengen variieren zwischen 2 und 5 µl. Die Auswertung der Peakflächen ergibt das Verhältnis St:B:A'= 3.16:2.37:1.00 bzw. St:B= 1.33:1.00. Der Faktor ist demnach abhängig von der Einspritzmenge.

Die Versuchsreihe 3, in Tabelle 12 aufgeführt, bestätigt die Ergebnisse. Hierbei werden von den zu gleichen Teilen miteinander gemischten Alkaloid-Stammlösungen jeweils 1-3 µl zu 1 µl Standardlösung gegeben. Die Einspritzmenge beträgt konstant 4 µl. Methanol dient, falls erforderlich, als Auffüllsubstanz. Die resultierenden Meßergebnisse zeigen die folgenden Verhältnisse auf: St:B:A'= 3.39:2.38:1.00 bzw. St:B= 1.42:1.00.
Der Mittelwert dieser drei Versuchsreihen soll bei der Auswertung berücksichtigt werden: St:B:A'= 3.27:2.36:1.00 und St:B= 1.38: 1.00. Der Faktor für Doronenin beträgt demnach F= 2.36.
Aus der Versuchreihe 2, deren Ergebnis in Abb.48 dargestellt ist, wird die Abhängigkeit zwischen Einspritzmenge und erhaltener Peakfläche ermittelt. Die linearen Funktionen zeigen kein abweichendes Verhalten bei Einspritzmengen zwischen 2 und 5 µl, so daß die Rohextrakte bei diesen Konzentrationen untersucht werden.

Die Eichgerade, die in Abb.49 wiedergegeben ist, leitet sich aus der Versuchsreihe 3 ab. Die steigenden Konzentrationen des gleichteilig zusammengesetzten Alkaloid-Gemisches werden bei konstanter Einspritz- und Standardmenge gegen die relativierten Alkaloidflächen aufgetragen. Die relativen Alkaloidflächen werden durch Bezug der gemessenen Alkaloidflächen zu den jeweiligen Standardflächen erhalten.
Die Auswertung der GC-Analysen der genau eingewogenen und mit internem Standard versehenen Alkaloid-Rohextrakte - Vent 1977, Vent 1978, Mte. Baldo 1978 - ist in den Versuchsreihen 4-6 wiedergegeben. Aus den gemittelten Werten der relativen Flächen wird die Gesamtkonzentration an Doronenin und Bulgarsenin graphisch ermittelt.
Unter Anwendung des Faktors für Doronenin wird die jeweilige pro-

zentuale Zusammensetzung des Rohextraktes an Doronenin und Bulgarsenin errechnet.

Tabelle 10. Versuchsreihe 1

Einspritzmenge [µl]		St	A'/B	B	A'
Doronenin	Bulgarsenin				
0.5	0.5	464	473	322	151
0.5	0.7	481	631	484	147
0.5	0.9	554	992	712	170
0.5	1.0	504	862	710	152
0.7	0.5	491	555	345	210
0.9	0.5	554	690	387	303
1.0	0.5	570	738	393	345

MW: $St:B_{rel}:A'_{rel} = 3.26:2.32:1.00$

$St:B_{rel} = 1.41:1.00$

Tabelle 11. Versuchsreihe 2

Einspritzmenge [µl]	St	A'/B	B	A'
2.0	464	533	373	160
2.5	499	475	319	150
3.0	696	749	520	229
3.5	759	826	574	252
4.0	978	976	690	286
4.5	1047	1184	967	227
5.0	1197	1365	1013	352

MW: St:B:A'= 3.16:2.37:1.00

St:B= 1.33:1.00

Tabelle 12. Versuchsreihe 3 = Eichgerade

Einspritzmenge A/B-Gemisch [µl]	St	A'/B	B	A'	A'/B / St
1.0	960	528	373	155	0.55
1.4	889	569	398	171	0.64
1.8	1002	882	624	258	0.88
2.0	975	994	692	302	1.02
2.2	966	1227	871	356	1.27
2.6	1111	1377	980	397	1.24
3.0	912	1322	921	401	1.45

MW: St:B:A'= 3.39:2.38:1.00
St:B= 1.42:1.00

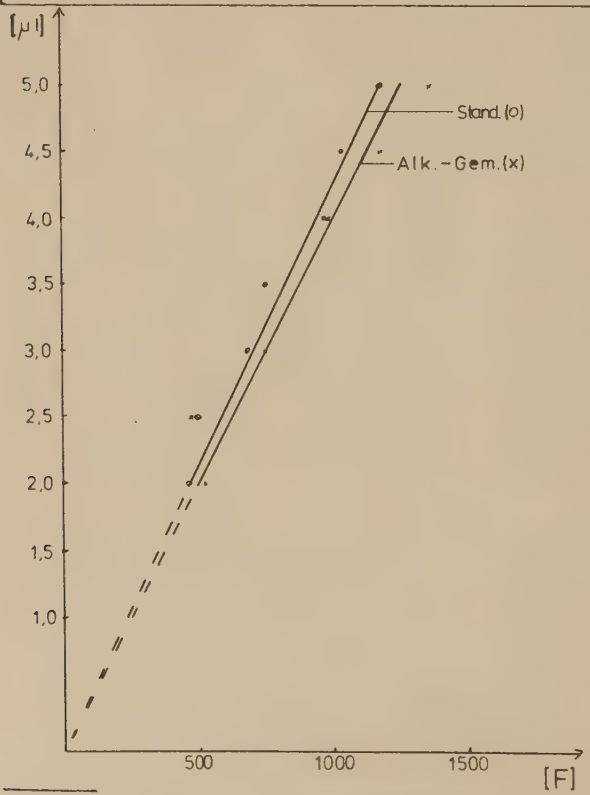


Abb.48. Ergebnis der Versuchsreihe 2

Tabelle 13.

Versuchsreihe 4: Vent 1977; Einwaage: 188.4 mg/10.0 ml

Einspritzmenge [µl]	St	A'/B	B	A'
2.0	442	473	348	125
3.0	761	894	640	254
4.0	918	1095	737	258
5.0	1084	1078	806	272

MW: $F[\frac{A'/B}{St}]$ = 1.11 ≙ 2.18 µl A/B-Gemisch = 2.834 µg A/B-Gemisch

MW: A= 45.95%, B= 54.05%

Versuchsreihe 5: Vent 1978; Einwaage: 211.8 mg/10.0 ml

Einspritzmenge [µl]	St	A'/B	B	A'
1.0	236	336	264	72
2.0	499	627	492	135
3.0	702	1049	800	249
4.0	1035	1372	1091	281

MW: $F[\frac{A'/B}{St}]$ = 1.38 ≙ 2.74 µl A/B-Gemisch = 3.575 µg A/B-Gemisch

MW: A= 41.5%, B= 58.5%

Versuchsreihe 6: Mte. Baldo 1978; Einwaage: 237.6 mg/10.0 ml

Einspritzmenge [µl]	St	A'/B	B	A'
1.0	318	556	497	59
1.5	471	797	699	98
2.0	612	966	848	118
2.5	787	1356	1170	186
3.0	821	1468	1286	182

MW: $F[\frac{A'/B}{St}]$ = 1.71 ≙ 3.39 µl A/B-Gemisch = 4.407 µg A/B-Gemisch

MW: A= 24.8%, B= 75.2%

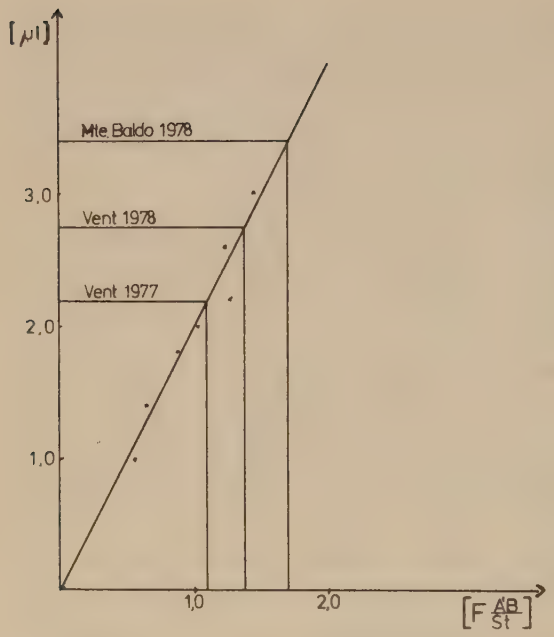


Abb.49. Ergebnis der Versuchsreihe 3

Bei der potentiometrischen Titration finden eine Glaselektrode und eine Ag/AgCl-Bezugselektrode Verwendung. Als Leitsubstanz dient im wasserfreien Milieu eine gesättigte ethanolische LiCl-Lösung, im wässrigen Milieu eine gesättigte KCl-Lösung. Gemessen wird in mV bei 25°C.

Als Lösungsmittel werden jeweils 10 ml 50%iger Ethanol benötigt. Bei der Berechnung wird das mittlere Molekulargewicht MG 330 zugrunde gelegt.

Zur Ermittlung des Alkaloidgehaltes (Titr. 1) werden zwei Bestimmungen durchgeführt. Die Einwaagen betragen 20.7 (Titr. I) und 39.3 mg (Titr.II). Abb.50 zeigt die Titrationskurven.

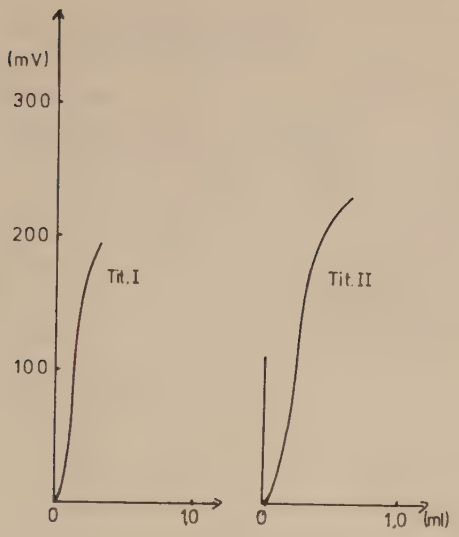


Abb.50. Bestimmung des Alkaloidgehaltes (Titr. 1)

Zur Bestimmung des Gehaltes an Alkaloiden und ihren N-Oxiden (Titr. 2) werden ebenfalls zwei Titrationen durchgeführt. Die N-Oxide werden einmal mit einem einfachen Überschuß an Zink in 4 ml 12%iger HCl und einmal mit einem doppelten Überschuß an 8 ml 12%iger HCl reduziert. Hierbei wird der genau gewogene Rohextrakt mit Zink versetzt und 30 min bei Raumtemperatur im salzsauren Milieu gerührt. Nach Ammoniakalisieren werden die Alkaloide dreimal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Das Extraktionsmittel wird anschließend abrotiert, die Alkaloide in 10 ml 50%igem Ethanol aufgenommen und mit HCl titriert. Die Titrationskurven sind in Abbildung 51 wiedergegeben.

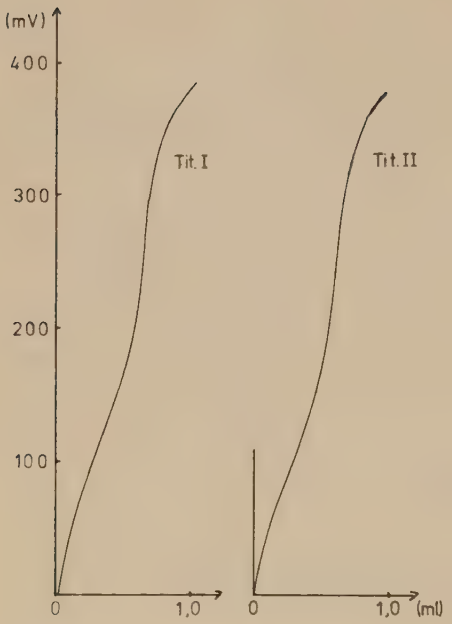


Abb.51. Bestimmung des Alkaloid- und N-Oxid-Gehaltes (Titr. 2)

Wie die übereinstimmenden Ergebnisse zeigen, verläuft die Reduktion schon mit einem geringen Überschuß an Zink quantitativ.

Einwaage	Titr. I	Titr. II
Rohextrakt (mg)	51.6	52.0
Zink (mg)	31.7	64.1
12%ige HCl (ml)	4.0	8.0

11. LITERATURVERZEICHNIS

1) *R.Adams* und *T.R.Govindachari*, J.Am.Chem.Soc. 71, 1953 (1949).

2) *R.Adams* und *B.L.van Duuren*, J.Am.Chem.Soc. 75, 2377 (1953).

3) *R.Robinson*, The structural relations of natural products, Claredon Press, Oxford 1955, S. 10.

4) *C.A.Hughes*, *R.Letcher* und *F.L.Warren*, J.Chem.Soc. 1964, 4974.

5) *D.H.G.Crout*, *M.H.Benn*, *H.Imaseki* und *T.A.Geismann*, Phytochemistry 5, 1 (1966).

6) *F.L.Warren*, Abh.Dtsch.Akad.Wiss. Berlin, Kl.Chem., Geol.,Biol. 3, 571 (1966).

7) *C.Hughes* und *F.L.Warren*, J.Chem.Soc. 1962, 34.

8) *R.Schoental*, Biochem.J. 88, 57 (1963).

9) *J.J.Lalich* und *L.A.Ehrhart*, J.Atheroscler.Res. 2, 482 (1962).

10) *R.Schoental*, Cancer Res. 28, 2237 (1968).

11) *L.B.Bull*, *C.C.J.Culvenor* und *A.T.Dick*, The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1968, S. 2.

12) *W.H.Chase*, Agri.J.Cape Good Hope 25, 675 (1904).

13) *W.Robertson*, J.Comp.Pathol.Ther. 19, 97 (1906).

14) *F.C.Willmott* und *G.W.Robertson*, Lancet 2, 848 (1920).

15) *K.K.Chen*, *P.N.Harris* und *C.L.Rose*, J.Pharmacol.Exp.Ther. 68, 130 (1940).

16) *J.J.Goldenhershel*, Klin.Med. 31, 56 (1943).

17) *J.J.Goldenhershel*, Am.Rev.Sov.Med. 1, 155 (1943).

18) *R.Schoental*, *M.A.Head* und *P.R.Peacock*, Br.J.Cancer 8, 458 (1954).

19) *R.Schoental*, Nature (London) 179, 361 (1957).

20) *A.R.Mattocks*, Nature (London) 217, 723 (1968).

21) *A.M.Clark*, Nature (London) 183, 731 (1959).

22) *A.M.Clark*, Z.Vererbungsl. 91, 74 (1960).

23) *C.M.Cook* und *A.C.F.Holt*, J.Genet. 59, 273 (1966).

24) *S.Avanzi*, Caryologia 14, 251 (1961).

25) *C.R.Green* und *G.S.Christie*, Brit.J.Exp.Pathol. 42, 369 (1961).

26) *A.E.Sundareson*, J.Pathol.Bacteriol. 54, 289 (1942).

27) *E.Röder* und *H.Wiedenfeld*, Phytochemistry 16, 1462 (1977).

28) *H.Braun*, Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1978, S. 201.

29) *W.Spaich*, Moderne Phytotherapie , Haug Verlag, Heidelberg 1978, S.332.

30) Bundesgesundheitsblatt 3, 141 (1960).

31) *A.Müller*, Heil- und Gewürzpflanzen 7, 7 (1924).

32) *H.Funke*, Naturheilpraxis 3, 253 (1978).

33) *L.B.Bull*, *C.C.J.Culvenor* und *A.T.Dick*, The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1968, S.234.

34) *I.Hirono*, *H.Mori* und *C.C.J.Culvenor*, Gann 67, 125 (1976).

35) *C.C.J.Culvenor*, *J.A.Edgar*, *L.W.Smith* und *J.Hirono*, Aust.J. Chem. 29, 230 (1976).

36) *R.Schoental*, Nature 227, 401 (1970).

37) *E.Röder*, unveröffentlichte Ergebnisse.

38) *A.Müller*, Heil- und Gewürzpflanzen 7, 15 (1924).

39) *G.Hegi*, Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. VI, 2.Hälfte, S. 751.

40) Flora Europaea, Bd. IV, S. 197, 1976-77.

41) *A.T.Dann*, Nature (London) 186, 1015 (1960).

42) *A.R.Mattocks*, J.Chromatogr. 27, 505 (1967).

43) *H.Wiedenfeld*, Isolierung, Strukturaufklärung und Partialsynthese eines Alkaloids aus Senecio Fuchsii, Dissertation Univ. Bonn, 1976.

44) *H.Budzikiewicz*, Fortschritte der Massenspektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim, 3, 229 (1975).

45) *C.C.J.Culvenor* und *W.G.Woods*, Aust.J.Chem. 18, 1625 (1965).

46) *E.Breitmaier* und *G.Bauer*, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1977, S. 58.

47) *A.Kirfel*, *H.Wiedenfeld*, *G.Will* und *E.Röder*, unveröffentlichte Ergebnisse.

48) *Nguyen Thi Nghia*, *P.Sedmera*, *A.Klasek*, *A.Boeva*, *L.Dranovska*, *L.Dolejs* und *F.Santavy*, Collect.Czech.Chem.Commun. 41, 2952 (1976).

49) *N.Neuner-Jehle*, *H.Nesvadba* und *G.Stiteller*, Monatsh.Chem. 96, 321 (1965).

50) *A.Klasek*, *P.Sedmera*, *A.Boeva* und *F.Santavy*, Collect.Czech. Chem.Commun. 38, 2504 (1973).

51) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1973, S. 539.

52) *K.Ziegler*, *A.Späth*, *E.Schaaf*, *W.Schumann* und *E.Winkelmann*, Justus Liebigs Ann.Chem. 551, 80 (1942).

53) *L.Horner* und *E.Winkelmann*, Angew.Chem. 71, 349 (1959).

54) *A.Löffler*, *R.J.Pratt*, *H.P.Ruesch* und *A.S.Dreiding*, Helv.Chim. Acta 53, 383 (1970).

55) *H.O.House* und *G.H.Rasmusson*, J.Org.Chem. 26, 4278 (1961).

56) *A.Kirrmann*, *P.Chancel*, *M.Vignalon* und *P.Federlin*, Bull.Soc. Chim. 1950, 707.

57) *O.Isler*, *H.Gutmann*, *M.Montavon*, *R.Rüegg*, *G.Ryser* und *P.Zeller*, Helv.Chim.Acta 40, 1242 (1957).

58) *F.Vögtle* und *E.Weber*, Kontakte (Merck) 1/77, 11.

59) *C.C.J.Culvenor* und *T.A.Geissmann*, J.Am.Chem.Soc. 83, 1647 (1961).

60) *C.W.Muth*, *R.S.Darlak*, *W.H.English* und *A.T.Hamner*, Anal.Chem. 34, 1163 (1962).

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn-Endenich) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Röder im Juni 1977 begonnen und im Dezember 1979 beendet.

Für die wohlwollende Unterstützung der vorliegenden Arbeit danke ich dem Direktor des Pharmazeutischen Instituts der Universität Bonn (Bonn-Endenich), Herrn Prof. Dr. H. J. Roth.

Dem Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen danke ich für die Bereitstellung von Sach- und Personalmitteln.

Herrn Prof. Dr. H. Pitschmann, Institut für Botanische Systematik und Geobotanik der Universität Innsbruck, danke ich für seine Hilfe bei der Beschaffung des Drogenmaterials.

Herrn Dr. H. Wiedenfeld danke ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Röder, der durch stete Ratschläge und wertvolle Hinweise die vorliegende Dissertation ständig förderte.

LEBENSLAUF

18.2.1951	Geboren in Bergisch Neukirchen Vater: Hans Frisse Mutter: Hanni Frisse, geb. Fiedeler
1957 - 1961	Besuch der kath. Volksschule in Opladen
1961 - 1971	Besuch der Landrat-Lucas-Schule I (mathem.-naturw. Zweig) in Opladen
12.5.1971	Abitur
1.9.1971 - 31.10.1971	Praktikum in der Blüten-Apotheke in Bergisch Neukirchen
1.11.1971 - 31.8.1973	Praktikum in der Falken-Apotheke in Opladen
7.9.1973	Pharmazeutisches Vorexamen in Düsseldorf
WS 1973/74 - SS 1974	Studium der Chemie in Köln
WS 1974/75 - SS 1977	Studium der Pharmazie in Bonn
19.3.1976	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung in Bonn
15.4.1977	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung in Bonn
2.8.1977	Erteilung der Approbation als Apotheker
1.6.1977	Beginn der vorliegenden Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. E. Röder

1.8.1978 - 30.4.1980	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn